

# THESES

présentées

## A LA FACULTE DE PHARMACIE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

(DIPLOME D'ÉTAT)

*par*

**P. DELRIEU**

EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

C.E.S. BACTÉRIOLOGIE - SÉROLOGIE - PARASITOLOGIE  
HÉMATOLOGIE - CHIMIE BIOLOGIQUE

### 1<sup>re</sup> THÈSE :

EMPLOI DE L'ACIDE PHYTIQUE POUR L'ÉTUDE  
DES GROUPEMENTS BASIQUES DES PROTÉINES  
DU SÉRUM SANGUIN ET DE L'URINE. APPLI-  
CATIONS A LA CHIMIE CLINIQUE.

### 2<sup>e</sup> THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

*Soutenues le 26 juin 1958*

M. le Professeur J.-E. COURTOIS

M. le Professeur M. PIETTE

M. le Professeur P. MALANGEAU }

*Président*

*Examineurs*

PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, RUE DEPARCIEUX, 29

1958



## FACULTE DE PHARMACIE

Nom du Candidat : DELRIEU

Prénom : PIERRE

Date de soutenance : 26 juin 1958

Numéro d'ordre : 76, Série E

DELRIEU (PIERRE) — Emploi de l'acide phytique pour l'étude des groupements basiques des protéines du sérum sanguin et de l'urine. Applications à la chimie clinique. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 146 p., 43 tabl.

(Thèse Pharm. (Etat), Paris, 1958, N° 76, Série E).

DELRIEU (PIERRE) — Emploi de l'acide phytique pour l'étude des groupements basiques des protéines du sérum sanguin et de l'urine. Applications à la chimie clinique. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 146 p., 43 tabl.

(Thèse Pharm. (Etat), Paris, 1958, N° 76, Série E).

DELRIEU (PIERRE) — Emploi de l'acide phytique pour l'étude des groupements basiques des protéines du sérum sanguin et de l'urine. Applications à la chimie clinique. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 146 p., 43 tabl.

(Thèse Pharm. (Etat), Paris, 1958, N° 76, Série E).

DELRIEU (PIERRE) — Emploi de l'acide phytique pour l'étude des groupements basiques des protéines du sérum sanguin et de l'urine. Applications à la chimie clinique. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 146 p., 43 tabl.

(Thèse Pharm. (Etat), Paris, 1958, N° 76, Série E).



# THESES

présentées

## A LA FACULTE DE PHARMACIE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

**P. DELRIEU**

EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

C.E.S. BACTÉRIOLOGIE - SÉROLOGIE - PARASITOLOGIE

HÉMATOLOGIE - CHIMIE BIOLOGIQUE

### 1<sup>re</sup> THÈSE :

EMPLOI DE L'ACIDE PHYTIQUE POUR L'ÉTUDE  
DES GROUPEMENTS BASIQUES DES PROTÉINES  
DU SÉRUM SANGUIN ET DE L'URINE. APPLI-  
CATIONS A LA CHIMIE CLINIQUE.

### 2<sup>e</sup> THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

*Soutenues le 26 juin 1958*

M. le Professeur J.-E. COURTOIS

M. le Professeur M. PIETTE

M. le Professeur P. MALANGEAU

*Président*

*Examineurs*

PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, RUE DEPARCIEUX, 29

1958



# Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

## ADMINISTRATION

MM. René FABRE, Doyen, C. ✱, ☉ C., *Membre de l'Institut*

R. DELABY, Assesseur, O. ✱, ☉ I.

G. CUVIER, Secrétaire général, ✱, ☉ I.

MM. JEANDEL, Secrétaire, ☉ I. — QUILLIOT, Rédacteur

Mme ESPINASSE, Rédactrice, ☉ I. — Mlle DENNY, Rédactrice,

Mlle BERIL, Rédactrice — Mme CELLIER, Commis, ☉ A.

Mlle MORIN, Commis, ☉ A. — Mlle BIDEAU, Commis — Mme CARON, Commis

## PROFESSEURS

|                                             |                                                               |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| MM. FABRE, Membre de l'Institut, C. ✱, ☉ C. | Toxicologie                                                   |
| DELABY, O. ✱, ☉ I.                          | Pharmacie chimique                                            |
| DOMANGE, ✱, ☉ I.                            | Chimie minérale                                               |
| CRETE, ✱, ☉ I.                              | Botanique                                                     |
| JANOT, ✱, ☉ I.                              | Pharmacie galénique                                           |
| VALETTE, ✱, ☉ I.                            | Pharmacodynamie                                               |
| BEDEL, ✱, ☉ I.                              | Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie          |
| PARIS, ✱, ☉ I.                              | Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale |
| GUILLOT, ✱, ☉ I.                            | Physique                                                      |
| GAUTIER, ✱, ☉ I.                            | Chimie analytique                                             |
| Mlle LAMBIN, ✱, ☉ I.                        | Microbiologie                                                 |
| MM. RAOUL, ☉ I.                             | Zoologie appliquée                                            |
| COURTOIS, ✱, ☉ I.                           | Chimie biologique                                             |
| N...                                        | Hygiène et Hydrologie                                         |
| N...                                        | Chimie organique                                              |
| MORETTE, ✱, ☉ I.                            | Professeur à titre personnel                                  |
| TRUHAUT, ✱, ☉ I.                            | Professeur à titre personnel                                  |
| CAVIER, ☉ I.                                | Professeur à titre personnel                                  |
| MOREAU, ✱, ☉ I.                             | Professeur sans chaire                                        |
| GUY, ☉ A.                                   | Professeur sans chaire                                        |
| GERMAN, ☉ A.                                | Professeur sans chaire                                        |

Doyen honoraire : M. RADAIS, C. ✱, ☉ I.

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE, C. ✱, ☉ I. — LEBEAU, C. ✱, ☉ I.

*Membres de l'Institut*

HERISSEY, C. ✱, ☉ I. — LAUNOY, O. ✱, ☉ I. — FLEURY, O. ✱, ☉ I.

MASCRE, O. ✱, ☉ I. — PICON, O. ✱, ☉ I.

## MAITRES DE CONFERENCES

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| MM. PIETTE, ☉ A. ....   | Sciences naturelles             |
| QUEVAUVILLER, ☉ A. .... | Sciences naturelles             |
| DAMIENS .....           | Sciences physiques et chimiques |
| DEYSSON, ☉ A. ....      | Sciences naturelles             |
| MALANGEAU, ☉ A. ....    | Sciences appliquées             |
| FLAHAUT .....           | Sciences physiques et chimiques |
| J. RENAULT .....        | Sciences physiques et chimiques |

## CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

|                             |                                                          |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|
| MM. BORY .....              | Sérologie                                                |
| BOURDON .....               | Chimie analytique (1 <sup>re</sup> année)                |
| CORRIEZ, ☉ I. ....          | Physique                                                 |
| DESVIGNES .....             | Microbiologie                                            |
| HARISPE, ☉ A. ....          | Chimie générale et pharmaceutique                        |
| LECLERC .....               | Chimie biologique                                        |
| Mlle LONGUEVALLE, ☉ I. .... | Service des examens de Chimie                            |
| MM. MANGEOT, ☉ A. ....      | Chimie (4 <sup>e</sup> année)                            |
| PELLERIN .....              | Chimie analytique (2 <sup>e</sup> /3 <sup>e</sup> année) |
| H. RENAULT, ☉ A. ....       | Chimie analytique (2 <sup>e</sup> /3 <sup>e</sup> année) |
| SAVEL .....                 | Parasitologie                                            |
| Mlle ROLLEN, ✱, ☉ A. ....   | Biologie végétale                                        |

## INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

|                         |                                                 |
|-------------------------|-------------------------------------------------|
| MM. GOUTAREL, ☉ A. .... | Chef de Travaux de Pharmacotechnie<br>galénique |
| Mlle MORIN .....        | Chef de Travaux de Pharmacodynamie              |
| M. LUSINCHI .....       | Chef de Travaux de Pharmacotechnie<br>chimique  |

## BIBLIOTHEQUE

Conservateur : M. GARNIER, ✱, ☉ I.

Bibliothécaires : Mlle LAVAUD, ☉ I.

Mmes DESGRIPPES, ☉ A. — KREHMER, ☉ A.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA CHÈRE MAMAN

*En témoignage de mon affectueuse  
reconnaissance et de mon attachement  
filial.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY

Professeur Honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris  
Pharmacien Honoraire des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine  
Membre de l'Académie de Médecine  
Officier de la Légion d'Honneur

*Qui a bien voulu nous accueillir dans  
son laboratoire et nous encourager souvent  
de ses conseils amicaux.*

*Hommage de respectueuse reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.-E. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui a bien voulu nous accepter comme élève dans son hôpital, qui n'a cessé de nous prodiguer ses précieux conseils et nous a permis de mener à bien ces recherches.*

*En témoignage de profonde gratitude et de respectueux attachement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. PIETTE

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

*Qui a bien voulu accepter de juger ce travail.*

*Hommage très respectueux.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MALANGEAU

Maître de Conférences

Pharmacien des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

*Qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury et s'est toujours intéressé à notre travail.*

*En témoignage de sincère reconnaissance.*

## A MONSIEUR ROLAND PERLÈS

Pharmacien Chef des Etablissements Nationaux  
Assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris

*Qui n'a jamais ménagé son temps pour  
nous prodiguer ses conseils désintéressés.*

*En témoignage de profonde reconnais-  
sance et d'amitié.*

## A MONSIEUR RENÉ BARRÉ

Pharmacien  
Docteur ès Sciences Physiques

*Qui nous a fait profiter de ses judicieux  
conseils.*

*En témoignage d'amitié.*

## INTRODUCTION

---

De multiples travaux ont été effectués sur la nature des protéines du sérum sanguin et de l'urine. Nombreuses ont été les recherches portant sur la composition des protéines en acides aminés et en particulier les bases hexoniques : les variations observées au cours de différentes affections hépatiques, rénales, etc. ont donné lieu à d'assez nombreux travaux.

Mais, à notre connaissance, on n'a jusqu'ici jamais proposé une méthode simple, utilisable en chimie clinique, pour étudier les variations de la teneur en groupes basiques des protéines au cours de différents états pathologiques.

C'est pour cette raison que nous avons, sur les conseils de Monsieur le Professeur J.-E. COURTOIS, entrepris des recherches dans ce sens en utilisant l'acide phytique pour déterminer les groupes basiques des protéines.

Ce travail a été envisagé à un double point de vue : celui des essais pharmaceutiques de préparations commerciales de protéines et l'étude des variations de la teneur en groupements cationiques basiques des protéines en chimie clinique.

Avant d'aborder la partie chimie clinique, nos essais préliminaires nous ont permis d'étudier les différentes modalités d'action de l'acide phytique et les conditions opératoires les meilleures. Nous avons pu appliquer le test à l'acide phytique aux différentes protéines du plasma.

Nous avons pu comparer la teneur en groupements cationiques basiques des protéines du sérum de sujets apparemment en bonne santé et au cours de diverses affections.

Enfin, nous avons montré les relations existant entre la teneur en groupements basiques des protéines sériques et des protéines urinaires au cours de la néphrose lipoidique.

Ces recherches ont été réalisées aux Laboratoires de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie et de l'Hôpital Bretonneau de Paris.

Je tiens à exprimer toute ma profonde reconnaissance à Monsieur P. FLEURY, Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie, pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire, pour sa bienveillance et les précieux conseils qu'il m'a donnés au cours de mes recherches.

Mon Maître, Monsieur J.-E. COURTOIS, Professeur à la Faculté de Pharmacie, a guidé mes premiers pas dans la recherche scientifique. Il a suivi jour par jour le développement de ce travail et ne m'a pas ménagé son appui et ses conseils autorisés. Envers lui va toute ma profonde et affectueuse reconnaissance et mon respectueux attachement.

J'ai été très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur M. PIETTE, Professeur à la Faculté de Pharmacie, en acceptant d'examiner ce travail et de faire partie du jury d'examen. Je lui exprime le sentiment de ma respectueuse gratitude.

J'exprime également tous mes remerciements à Monsieur le Professeur P. MALANGEAU, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie, qui a bien voulu faire partie de mon jury d'examen et a toujours porté intérêt à mes recherches.

Je suis heureux d'exprimer ma gratitude à Monsieur René BARRÉ, Docteur ès Sciences, et à Monsieur Roland PERLÈS, Assistant à la Chaire de Chimie Biologique ; ils m'ont fait profiter de leur expérience dans le domaine de la recherche et ont toujours été des conseillers précieux et amicaux.

Il m'est aussi agréable de pouvoir exprimer mes sincères remerciements à Mlle N. SETTIER, aide technique au Laboratoire de l'Hôpital Bretonneau, et Mlle M. GERMAIN, aide technique subventionnée par la Sécurité Sociale ; elles m'ont apporté un concours efficace pour la réalisation des expériences en série et la surveillance de celles de longue durée.

---

# PREMIERE PARTIE

---



## CHAPITRE I

### HISTORIQUE

---

#### I. — RECHERCHES SUR LES COMBINAISONS ESTERS PHOSPHORIQUES-PROTÉINES

Deux chercheurs polonais, S. LINDENBAUM [82] et E. MNICH [90], signalèrent, dès 1926, l'existence de combinaisons entre l'acide inosito-hexaphosphorique, ou acide phytique, et les protéines des graines de Fève.

Ils observèrent que ces combinaisons étaient insolubles vers pH 3,0, et pouvaient se redissoudre dans un milieu plus acide ou au contraire plus alcalin.

Cette propriété de donner des combinaisons insolubles avec l'acide phytique dans une certaine zone de pH, put ensuite être généralisée à un grand nombre d'autres protéines d'origine végétale ou animale : graines de Chanvre (PISCHINGER [98]), de Blé (WIAZOWNICKA [132]), de Pois et Cotonnier (FONTAINE, PONS et IRVING [46]), d'Arachide (HELLOT et MACHEBŒUF [68]), du tubercule de Pomme de Terre (HOFSTEE [72]), protéines sériques (HELLOT et MACHEBŒUF [68]), et ovalbumine (MATTSON et KOUBLER-ANDERSON [88]).

#### II. — ÉTUDE SYSTÉMATIQUE DES COMBINAISONS DÉRIVÉS PHOSPHORÉS-PROTÉINES

Ce caractère de précipitation avec les protéines paraît être une propriété assez générale des dérivés phosphorés acides. R. BARRÉ [9] en utilisant la précipitation phytique en pH acide a pu montrer que la prétendue caséine d'amandes était en réalité l'association de l'acide phytique à au moins deux fractions protéiques distinctes, qui furent dénommées amando-albumine et amando-globuline.

Au stade ultérieur, J.-E. COURTOIS et R. BARRÉ [33 - 34] ont été amenés à rechercher :

a) si d'autres dérivés phosphorés précipitaient d'une façon analogue les protéines des amandes ;

b) si l'acide phytique et les autres dérivés phosphorés expérimentés se comportaient d'une façon analogue avec les protéines d'autres origines.

a) PRÉCIPITATION DES PROTÉINES PAR LES DÉRIVÉS PHOSPHORÉS EN FONCTION DU pH

Ces essais furent réalisés avec seize dérivés phosphorés minéraux ou organiques et avec quatre protéines distinctes : l'une d'origine animale, l'insuline, les trois autres d'origine végétale : la légumine : globuline des graines de Pois (*Pisum sativum* — Légumineuses); l'amando-albumine et l'amando-globuline des graines d'Amandier.

Les comportements des dérivés phosphorés furent sensiblement identiques avec ces quatre protéines différentes.

Ces auteurs purent ainsi classer les dérivés phosphorés en deux groupes principaux :

1) Dans le premier groupe figurent les acides orthophosphorique, pyrophosphorique, glycérophosphorique, phénylphosphorique et p. nitrophénylphosphorique.

Ces dérivés phosphoriques ne modifient que faiblement la courbe de solubilité de la protéine en fonction du pH ; la zone de précipitation est un peu élargie vers les pH acides, et si l'on assimile le point du minimum de solubilité de la protéine à son point isoélectrique, celui-ci est abaissé.

Par ailleurs, la teneur en phosphore du précipité protéique demeure assez constante tout au long de la zone de précipitation.

D'autres dérivés ont pu être adjoints à ce premier groupe, ce sont les acides saccharosemonoorthophosphorique, fructosediphosphorique, phosphoglycolique et morpholinoéthanol-phosphorique. La zone de pH où la protéine se trouve insolubilisée est un peu plus étendue. Si la précipitation débute encore vers pH 6,0, la protéine demeure insolubilisée jusque vers pH 2,5 - 3,0.

2) Dans le second groupe figurent l'ester diphosphorique de la méthyl-2-naphtohydroquinone (synkavit Roche), les acides inositoltriphosphorique et inositolhexaphosphorique (phytique).

Ils fournissent des courbes de solubilité semblables, précipitation en dessous de pH 4,6 devenant presque totale vers pH 3,8.

La différence essentielle avec le premier groupe réside surtout dans le fait que les précipités protéiques ne se redissolvent pas jusqu'à des pH très bas, ils ne passent en solution que vers pH 1,0.

Ces auteurs ont pu montrer que la proportion du phosphore fixée sur le précipité est nettement plus élevée que pour les dérivés du premier groupe. Cette quantité croît pour les corps du deuxième groupe de pH 6,0 à pH 2,5 - 2,0. Puis elle décroît en dessous de pH 1,7 au moment où le précipité est redissous en milieu fortement acide.

L'acide benzylphosphorique forme la transition entre les deux groupes. Suivant la protéine examinée, il peut se comporter comme un dérivé du premier ou du deuxième groupe.

Au deuxième groupe peuvent être rattachés les acides métaphosphoriques qui sont des acides polyphosphoriques du type  $(\text{PO}_3\text{H})_n$ , où  $n$  peut varier de 3 à 30 et plus.

Ils précipitent les protéines : cette propriété est utilisée depuis longtemps pour déféquer les protéines dans les extraits d'organes ou les humeurs.

#### b) PROPRIÉTÉS PARTICULIÈRES DE L'ACIDE PHYTIQUE

Des essais plus détaillés furent réalisés récemment avec un représentant caractéristique des deux principaux groupes.

R. BARRÉ, J.-E. COURTOIS et G. WORMSER [15] ont choisi :

a) L'acide  $\beta$ -glycérophosphorique, substrat classique des recherches sur les phosphatases.

b) Et l'acide phytique qui avait fourni les combinaisons les plus insolubles et les plus riches en phosphore.

Ces auteurs ont étudié la structure de l'acide phytique ; les courbes de titration et de conductivité indiquent que l'acide phytique possède quatre fonctions acides très faibles de pK voisin de 9,7, deux fonctions acides faibles de pK voisin de 6,3 ; ces deux fonctions ont une force semblable à celle de la deuxième fonction de l'acide orthophosphorique.

Enfin, l'acide phytique possède six fonctions acides fortes de pK voisin de 1,84, comparables à la première fonction acide de l'acide orthophosphorique.

R. BARRÉ et J.-E. COURTOIS [13] ont montré que de pH 4,0 à pH 2,0 la combinaison acide phytique-protéine paraissait être peu dissociée : avec une quantité fixe de protéine et des doses variables d'acide phytique la teneur en phosphore du précipité formé n'aug-

mente qu'assez faiblement lorsque l'on fait croître la concentration en acide phytique du milieu.

La combinaison protéine-acide glycérophosphorique est comparativement beaucoup plus dissociable, ceci se manifeste par une augmentation régulière de la teneur en phosphore du précipité lorsque l'on fait réagir des doses croissantes d'acide glycérophosphorique sur une dose constante de protéine.

### III. — INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR LES COMBINAISONS ACIDE PHYTIQUE-PROTÉINES

Les mêmes auteurs (R. BARRÉ, J.-E. COURTOIS et G. WORMSER [16]) ont suivi par des mesures conductimétriques et potentiométriques la formation des combinaisons de l'acide phytique avec l'amando-albumine ou la sérum-albumine humaine.

Les résultats obtenus leur ont permis de proposer l'interprétation suivante du mécanisme de la précipitation des protéines par l'acide phytique ; tout se passe comme si ce corps se combinait aux groupements basiques ionisables de la protéine (groupes cationiques) :

a) En milieu neutre ou faiblement alcalin, où toutes les fonctions acides fortes ou moyennes de l'acide phytique se trouvent salifiées, il ne paraît pas se former de combinaison avec la protéine.

b) Dans une zone faiblement acide située entre pH 7,0 et le point isoélectrique de la protéine, les fonctions acides progressivement libérées du phytate se combinent aux groupes basiques de la protéine ; cette combinaison est le plus souvent soluble ou, si elle précipite, est pauvre en phosphore.

c) En dessous de pH 4,5 jusque vers pH 2,0 les six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique sont alors mises en liberté, elles viennent salifier les groupes basiques de la protéine.

Ces groupes appartiennent principalement, sinon presque exclusivement, aux bases hexoniques : arginine, histidine et lysine ; l'un de leurs groupements basiques se trouve inclus dans une liaison peptidique tandis que le second est salifiable par l'acide phytique.

L'acide phytique représente le composé phosphoré organique le plus riche en phosphore parmi ceux qui se rencontrent en biochimie ; en effet, chaque atome de carbone y est relié à un atome de phosphore ; c'est vraisemblablement cette accumulation de phosphore sur

une molécule carbonée qui a permis à R. BARRÉ [9] de proposer une interprétation à la grande insolubilité des combinaisons acide phytique-protéines.

La salification des groupements basiques par l'acide phytique s'accompagne de plissements et repliements des séquences polypeptidiques ; en effet, les groupements basiques viennent s'agglomérer par fraction de six autour du noyau cyclohexanique de l'acide phytique, noyau qui est vraisemblablement sous forme de « chaise » [15]. Cette réunion à la périphérie du noyau provoquera :

1° Un pliage ou un resserrement des chaînes et hélices polypeptidiques lorsque deux au moins des groupements basiques seront situés dans la même chaîne ou la même hélice.

2° Le rapprochement des séquences polypeptidiques ou leur écartement lorsque l'acide phytique salifiera des groupements basiques appartenant à des chaînes ou hélices distinctes.

Les diverses modifications spatiales de la molécule protéique que l'on peut ainsi concevoir s'accompagneront de la destruction de liaisons intramoléculaires du type hydrogène ; les changements en résultant dans l'architecture de la molécule protéique, joints aux modifications des charges électriques par suite de la salification, entraînent l'insolubilisation de la combinaison acide phytique-protéine.

d) Lorsque l'acidité augmente en dessous de pH 1,0 à 2,0, la combinaison se redissout, l'acide chlorhydrique concentré déplace l'acide phytique et ses combinaisons et le solubilise tandis que, simultanément, la protéine passe en solution sous forme de chlorhydrate.

e) Enfin, ces auteurs ont montré l'importance de la force ionique du milieu. En effet, lorsqu'ils opèrent en présence de chlorure de cations bivalents (calcium et magnésium) ils observent une redissolution de la combinaison acide phytique-protéine, par effet de la force ionique du milieu lorsque la concentration en chlorure métallique croît.

#### IV. — INFLUENCE DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE

L'interprétation qu'ont proposée ces auteurs a pour conséquence deux facteurs influençant l'insolubilité de la combinaison dérivé phosphoré-protéine : le poids moléculaire de la protéine et sa teneur en groupes basiques.

a) INFLUENCE DU POIDS MOLÉCULAIRE

Une protéine du poids moléculaire élevé subira une plus forte modification de son architecture et sera plus aisément insolubilisée par l'acide phytique ; précisément, l'acide phytique n'insolubilise pas la gélatine (R. HILL et C. TYLER [70]), la peptone tryptique (J.-E. COURTOIS et R. BARRÉ [33]). R. BARRÉ [10] a montré que les produits de dégradation de l'édésine par la pepsine n'étaient pas précipités par l'acide phytique, il a proposé de suivre ainsi l'évolution d'une hydrolyse pepsique. J.-E. COURTOIS et Mme VILLIERS-HUIBAN [35] ont étudié systématiquement l'emploi de l'acide phytique pour déterminer l'activité de préparations pharmaceutiques de pepsine. La protéine non dégradée est précipitée par l'acide phytique et dosée selon la technique du biuret ; il est également possible de doser par colorimétrie du biuret, les produits d'hydrolyse pepsique non précipitables par l'acide phytique.

b) INFLUENCE DE LA TENEUR EN GROUPES BASIQUES

Des protéines de faibles poids moléculaires mais riches en bases hexoniques, comme les protamines, sont précipitables par l'acide phytique.

D'autre part, R. BARRÉ et J.-E. COURTOIS [13] ont montré que la décomposition d'une partie des groupes basiques de l'amandalbumine par l'acide nitreux ou leur blocage par le formaldéhyde diminue considérablement la teneur en acide phytique de la combinaison précipitée, sans en diminuer l'insolubilité.

## V. — CONCLUSIONS

De tous les dérivés phosphorés étudiés par les précédents auteurs, il semble que l'acide phytique est susceptible de donner avec les protéines les combinaisons les plus stables et les plus riches en phosphore.

L'insolubilité de la combinaison s'accroît avec l'acidité du milieu.

Ainsi, avec les quelques protéines étudiées, chacune des six fonctions acides les plus fortes ( $pK = 1,84$ ) [15] de l'acide phytique, se combine à un groupe basique de la protéine. Une telle salification entraîne les repliements ou écartements des séquences polypeptidiques, ce qui se traduit par une insolubilisation de la protéine.

Il semble donc possible d'envisager l'emploi de l'acide phytique en pH acide pour la précipitation des protéines et pour la détermination éventuelle de leur teneur en groupements basiques.

## CHAPITRE II

---

### I. — METHODES ANALYTIQUES

Dans ce chapitre, nous décrirons les techniques générales que nous avons utilisées au cours de nos recherches.

— La précipitation phytique en pH acide, les dosages de l'azote total et du phosphore lié dans les combinaisons acide phytiqueprotéines. Le calcul du nombre de groupements cationiques basiques.

— Les techniques de mesure du pH des liqueurs surnageantes et d'électrophorèse sur papier des sérums.

— La méthode de relargage au sulfite de sodium de R. ARDRY. Les techniques spéciales que nous avons utilisées pour le fractionnement des protéines sériques ou urinaires seront exposées dans les chapitres y correspondant.

#### A. — PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE PHYTIQUE

La précipitation des protéines est effectuée par l'acide phytique à  $\text{pH } 2,30 \pm 0,5$ . Nous exposerons ici la technique utilisée dans le cas du sérum sanguin. Elle est également valable pour toute solution ayant une même concentration en protéines. En outre, elle est également valable avec des solutions protéiques moins concentrées, pourvu que l'on conserve le rapport suivant : 1,5 mg d'azote protéique pour 0,5 mg de phosphore.

Dans deux tubes à centrifuger, nous mesurons dans l'ordre pour chaque tube :

1 ml de solution d'inositohexaphosphate de sodium M/20 en acide phytique, soit M/3,33 en acide phosphorique estérifié — 1 ml de sérum — 14,7 ml d'eau distillée.

Nous acidifions à pH 2,30 par addition goutte à goutte et en agitant de 3,3 ml d'acide chlorhydrique 0,2 N.

Après une heure de repos à la glacière, nous centrifugeons à 6.000 tours pendant cinq minutes ; le précipité se collecte aisément. Nous décantons le liquide surnageant et laissons égoutter les tubes retournés sur une feuille de papier filtre.

Nous vérifions que les protéines sont intégralement précipitées en ajoutant à 1 ml du liquide surnageant 1 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100 ; aucun louche ne doit se produire.

## B. — DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Nous avons utilisé la méthode de Kjeldahl. Le précipité du premier tube est délayé à l'aide d'un agitateur dans 4 ml d'acide sulfurique au demi et transvasé dans une fiole de Kjeldahl de 150 ml ; le tube à centrifuger est rincé à trois reprises avec 5 à 6 ml d'eau distillée ; les liquides de lavage étant transvasés dans le matras de Kjeldahl.

Nous concentrons par chauffage et minéralisons en présence de 0,20 g du mélange catalyseur de Boivin (poids égaux de sulfate cuivrique, sulfate mercurique, oxyde mercurique jaune).

L'ammoniaque est séparé par distillation dans un appareil de Pregl et titré au fur et à mesure de son passage par l'acide sulfurique décimormal en présence de l'indicateur rouge de méthyle-bléu de méthylène [53], soit  $n$  ml utilisés, la teneur en g de protéines considérées comme renfermant 16 p. 100 d'azote total par litre de sérum est :

$$n \times 0,0014 \times 6,25 \times 1.000 = n \times 8,75$$

## C. — DOSAGE DU PHOSPHORE SOUS FORME D'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE

Le précipité du second tube est délayé à l'aide d'un agitateur dans 6 ml d'acide nitrique pur  $d = 1,33$ , nous transvasons dans un matras de Kjeldahl de 150 ml, rinçons quatre fois le tube avec 5 ml d'eau distillée et l'ajoutons au contenu du matras, nous introduisons alors trois billes de verre et 2 ml d'acide sulfurique  $d = 1,83$ . Nous chauffons régulièrement pendant 2 h 30 en évitant de chasser l'acide

sulfurique. Nous transvasons alors dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml et rinçons avec 20 ml d'eau distillée, nous laissons en contact dix minutes, pour que le liquide échauffé, les acides polyphosphoriques formés au cours de la minéralisation soient hydrolysés en acide orthophosphorique ; nous ajoutons alors 40 ml de mixture magnésienne (nitrate de magnésium 50 g, nitrate d'ammonium 100 g, eau distillée q.s.p. 1 litre). Nous alcalinisons par addition d'ammoniaque jusqu'à teinte rose franc de la phénolphthaléine ajoutée. Après repos de 24 h à la glacière, le phosphate ammoniaco-magnésien précipité est séparé par filtration sur papier et lavé à l'eau ammoniacale. Nous introduisons dans l'Erlenmeyer 10 ml d'acide nitrique au cinquième en volume pour redissoudre le phosphate adhérent aux parois, transvasons sur le filtre, rinçons vase et filtre par 10 ml d'acide nitrique au 1/5<sup>e</sup>. La solution obtenue est introduite dans une ampoule de Copeaux [32], et nous dosons l'acide orthophosphorique selon la méthode de cet auteur, par formation d'un complexe phospho-éthéro-aqueux duodécylmolybdique. Nous avons vérifié qu'il était également possible d'effectuer un dosage sur une portion aliquote de la solution nitrique, en ayant recours à la méthode nitro-molybdo-vanadique de Misson. Nous avons suivi la technique de P. FLEURY et M. LECLERC [57]. La précipitation de l'acide orthophosphorique sous forme de sel ammoniaco-magnésien assure plus de sécurité à la méthode, mais la rend plus lente. Lorsque l'on désire obtenir un résultat rapide, l'acide orthophosphorique peut être déterminé directement sur le liquide de minéralisation dilué. Les résultats sont exprimés en grammes de phosphore précipités sous forme de combinaisons acide phytique-protéines, à partir d'une litre de sérum.

#### D. — CALCUL DU NOMBRE TOTAL DE GROUPES BASIQUES IONISABLES : Nbt

Comme il est d'usage, nous les exprimons conventionnellement par rapport à une protéine d'un poids moléculaire de 100.000 et renfermant 16 p. 100 d'azote total, ce qui permet de comparer les protéines de poids moléculaires différents. Dans ces conditions, un groupe basique ionisable correspond à la fonction acide la plus forte d'un radical d'acide orthophosphorique estérifiant l'une des fonctions alcool du mésoinositol, soit 31 g de phosphore associé à 10<sup>6</sup> g de protéine. Soit p la teneur en protéines du sérum (en grammes par litre), q le nombre de g de phosphore lié sous forme d'acide phytique aux protéines d'un litre de sérum, le nombre Nbt de groupes

basiques ionisables pour  $10^5$  g de protéines sera calculé d'après la formule :

$$Nbt = \frac{q}{p} \times 100 \times \frac{10^5}{31} = \frac{q \times 3.226}{p}$$

## E. — MESURE DU pH

Dans tous nos essais, nous avons déterminé les pH des liqueurs surnageantes à l'aide d'un pH-mètre Jouan à électrode de verre. Ce pH-mètre permet la mesure d'un pH avec une précision de 0,05 unité.

## F. — ÉLECTROPHORÈSE

Nous avons utilisé l'électrophorèse sur papier, en employant une technique sensiblement identique à celle de W. GRASSMANN [63].

Nous utilisons un appareil à électrophorèse Biolyon, comportant un générateur électrique de courant continu pouvant donner de 110 volts à 350 volts suivant la résistance envisagée, et deux cuves permettant chacune d'étudier 4 bandes ; chaque cuve comprend 2 bacs dans lesquels trempent les extrémités des bandes de papier lestées de masselottes de verre. Les bandes de papier étant horizontales dans la région prévue pour la migration des protéines. Deux électrodes de platine plongent dans les deux bacs, et une cuve de verre recouvre le tout, de façon à opérer en atmosphère saturée d'eau.

### a) LE PAPIER

Nous avons utilisé du papier Biolyon n° 1 (ou Arches 302) découpé en bandes très régulières et homogènes de 4 cm de largeur sur 54 cm de longueur.

### b) LE TAMPON

La solution tampon est une solution de barbital sodique de pH 8,65.

- Solution A  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Barbital sodique : 41,20 g (*)} \\ \text{OH}_2 \text{ distillée : 2.000 ml} \end{array} \right.$
- Solution B (Solution ClH N/10)

---

(\*) Vérifier que le barbital sodique n'est pas souillé d'alcali.

On mélange 1.742 ml de solution A à 258 ml de solution B. On vérifie que le pH est de 8,65. On peut se servir sans inconvénient de ce tampon pendant 6 fois environ.

#### c) CARACTÉRISTIQUES ÉLECTRIQUES

On fait passer un courant de 110 volts sous une intensité de 0,5 milliampère par centimètre de largeur de bande pendant 14 heures.

#### d) MISE EN ROUTE

Les bandes de papier, lestées d'une masselotte de verre à chaque bout, sont disposées horizontalement sur le support au-dessus des bacs ; le support est alors abaissé de façon que le papier trempe dans la solution tampon sur les  $\frac{3}{4}$  de la hauteur des masselottes.

Du côté de l'électrode négative, on trace à 1 cm du support une ligne de départ sur le papier. On recouvre de la cloche de verre et on laisse le papier s'humecter. En général, il faut environ 2 heures pour avoir une humectation suffisante. (Le fait de laisser le papier s'humecter donne de meilleurs « clichés ».)

Lorsque le papier est humecté suffisamment, on place les deux électrodes et on fait passer le courant pendant une dizaine de minutes au préalable.

Puis, sur le trait de départ, en ayant soin de laisser de part et d'autre 0,5 cm, on étale le sérum à étudier.

#### e) L'ÉTALEMENT

Se fait avec une pipette spéciale du type mélangeur de Potain. Nous nous sommes servis d'une pipette Elphor. Sans arrêter le courant, nous étalons 0,01 ml de sérum. L'étalement terminé, nous remettons la cloche de verre. Il suffit de vérifier une heure après si le courant est stable. En général, il s'établit dans la cuve un équilibre de température et une atmosphère saturée de vapeur d'eau et l'intensité reste constante pendant les 14 heures (\*) de l'opération.

---

(\*) La technique électrophorétique telle qu'elle est décrite nous a permis de trouver par électrophorèse des valeurs identiques à celles fournies par la méthode de relargage au sulfite de sodium de R. ARDRY [3].

### f) SÉCHAGE

Après ce temps, on arrête le courant. On prélève la partie horizontale des bandes de papier et on les sèche. Nous disposons de lampes à infra-rouge (il est également possible de sécher les bandes à l'étuve à 100°).

De façon à obtenir des résultats comparables, nous avons toujours laissé un temps strictement déterminé sous les lampes de séchage (un temps plus ou moins long provoque une fixation plus ou moins importante de colorant par libération de groupements réactifs. Ceci est également valable pour les temps de coloration et de lavage).

Une durée de 15 minutes en plaçant les bandes de papier à 20 cm environ des lampes s'est révélée satisfaisante.

### g) COLORATION

Nous plongeons les bandes séchées pendant deux minutes dans la solution colorante :

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| — Bleu de bromophénol ..... | 1 g    |
| — Chlorure mercurique ..... | 30 g   |
| — Ethanol à 95° .....       | 100 ml |

A cette solution, nous ajoutons 10 p. 100 en volume d'une solution à 1 p. 100 de Bleu de Bromothymol dans l'éthanol à 95°. De cette façon, nous évitons l'emploi des coefficients nécessaires lors de l'utilisation du Bleu de Bromophénol seul, qui ne se fixe pas d'une façon proportionnelle aux quantités de protéines, ce qui favorise les albumines au détriment des globulines.

### h) LAVAGE

Après deux minutes de contact avec le colorant, les bandes sont lavées à l'eau courante jusqu'à décoloration complète du fond du papier. Ensuite ces bandes sont remises à sécher sous les lampes à infra-rouge pendant une quinzaine de minutes.

## LECTURE DU PROTIDOGRAMME

Pour l'obtention d'un tracé à partir des bandes colorées, nous nous sommes servis d'un dispositif de lecture où la bande est éclairée par une source lumineuse aussi régulière que possible ; la lumière

transmise par la bande est reçue par une cellule photoélectrique, qui débite sous un milliampèremètre, dont les indications sont pointées en fonction du déplacement de la bande.

Le lecteur, dont nous nous sommes servis, est un appareil Biolyon, bicellulaire, relié à un milliampèremètre, dont on ramène les déviations à zéro par un tambour, lequel est gradué en degrés Vernes.

Les bandes colorées sont immergées pendant 5 minutes dans l'huile de paraffine, puis bien séchées entre deux feuilles de papier filtre. Les bandes sont placées sur le portoir du lecteur et, en commençant par la sérum-albumine, l'on note chaque déviation.

## DECOMPOSITION DES COURBES ET PLANIMETRIE

Il est assez généralement admis que la fixation du colorant sur les diverses protéines est sensiblement la même quelle que soit la protéine considérée. On détermine l'intensité de la coloration obtenue à l'aide d'un électrophotomètre Biolyon établi à cet effet.

On porte en abscisses les longueurs de la bande et en ordonnées les intensités de coloration, et dessine ensuite la courbe représentative. La surface comprise entre la courbe et l'axe des abscisses est proportionnelle à la concentration protéique totale. Il a été démontré que l'on peut décomposer cette surface en surfaces délimitées par les courbes de GAUSS. La somme de ces surfaces doit être égale à la surface totale, et, chacune de ces mêmes surfaces est proportionnelle à la concentration d'une fonction protéique particulière : sérum-albumine,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  globulines. Le rapport  $\times 100$  des surfaces délimitées par les différentes courbes de GAUSS à la surface totale donne le pourcentage des différentes fractions protéiques par rapport à la concentration protéique totale.

## G. — RELATIONS ENTRE LE RAPPORT ALBUMINES/GLOBULINES : Nbc

Nous avons obtenu à partir d'échantillons purifiés de sérum-albumine et sérum-globuline humaines des teneurs en groupements azotés basiques correspondant à celles relevées dans la littérature ; soit d'après les données de HAUROWITZ [66] et TRISTRAM [125] : 142 pour 10<sup>5</sup> g de sérum-albumine et 100 pour 10<sup>5</sup> g du mélange globulinique du sérum.

Le Nbt, nombre de groupes basiques pour 10<sup>5</sup> g de protéines sériques, devrait donc se situer entre les valeurs extrêmes de 100 et 142, les valeurs intermédiaires s'étageant selon les proportions respectives des albumines et globulines. Il est donc possible d'interpréter nos résultats en fonction de ces proportions ; si « a » représente le pourcentage des albumines dans les protéines sériques, « b » celui des globulines (a + b = 100), il est permis de considérer que le nombre de groupes basiques calculé Nbc ou nombre de groupes basiques déterminé d'après le rapport SA/SG fourni par électrophorèse est donné par la formule :

$$\text{Nbc} = \frac{(a \times 142) + (b \times 100)}{100} = (1,42 a + b)$$

*En conclusion*, sur chaque sérum étudié nous comparerons deux valeurs différentes du nombre de groupes basiques par une protéine d'un poids moléculaire de 100.000 renfermant 16 p. 100 d'azote.

- *Le nombre total Nbt* obtenu d'après le rapport P/N du précipité de phytate de protéine.
- *Le nombre calculé Nbc* calculé d'après les pourcentages d'albumines et globulines obtenus par électrophorèse.

## H. — MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT AU SULFITE DE SODIUM

Nous avons utilisé la méthode de relargage au sulfite de sodium de R. ARDRY [3] pour les protéines sériques. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux fournis par l'électrophorèse.

A une époque où cette méthode n'était pas encore une technique classique de laboratoire, nous nous sommes servis des résultats fournis par la méthode de relargage au sulfite de sodium, considérés comme bases de références, et nous avons réglé notre appareil à électrophorèse et ordonné la technique de telle sorte que nous puissions obtenir des résultats comparables. Résultats comparables, non seulement avec des sérums de sujets apparemment en bonne santé, mais encore avec des sérums de sujets atteints de différentes affections.

Nous n'avons pas utilisé la méthode de R. ARDRY d'une façon continue au cours de nos recherches, pour contrôler périodiquement nos résultats. C'est la raison pour laquelle nous ne décrirons pas en détail cette méthode, mais en exposerons un bref résumé.

Sur une première prise d'essai les protéines totales du sérum sont précipitées par une solution d'acide trichloracétique. Sur d'autres prises d'essai nous précipitons avec des solutions de molarité décroissante en sulfite de sodium ; les différentes fractions globuliniques sont précipitées après séjour d'une nuit à  $+ 37^{\circ}$ .

La teneur en azote total est déterminée sur chaque précipité, par la méthode de Kheldahl, après une minéralisation sulfurique (technique identique à celle précédemment décrite). En utilisant le coefficient habituellement admis de 6,25, on calcule alors la teneur en protéines.

A titre d'exemple, nous avons rassemblé dans le *tableau I* les valeurs comparées des pourcentages respectifs des différentes fractions protéiques du sérum obtenues d'une part par électrophorèse, d'autre part par la méthode au sulfite.

Les résultats obtenus sont ceux correspondant à la standardisation de la méthode électrophorétique.

Nous avons comparé ces deux méthodes pour la néphrose lipoïdique ; on savait en effet que les valeurs fournies par la méthode classique de précipitation au sulfate d'ammonium [77] ne fournit pas de résultats comparables à ceux obtenus par électrophorèse dans cette affection.

Dans l'ensemble, avec les trois sérums, il existe une concordance assez satisfaisante entre les résultats obtenus par deux méthodes aussi distinctes.

## II. — CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Nous avons dû faire appel à l'amicale collaboration de multiples collègues qui prélevèrent du sang à notre intention. Nous avons été amenés à envisager l'influence de la conservation du sérum ainsi que l'hémolyse à partir du caillot sur la valeur du Nbt.

### 1) ACTION DE LA CHALEUR

La chaleur a été le premier agent connu de dénaturation des protéines. La dénaturation est, d'après PUTNAM [100], « un réarrangement physique ou intra-moléculaire, plutôt qu'une altération chimique de la structure de la protéine « native » qui conduit à une transfor-

TABLEAU I

Valeurs comparées des pourcentages respectifs des différentes fraction protéiques du sérum obtenus par électrophorèse et relargage au sulfite de sodium

| Méthodes                 | Sérum normal |            |            |         |          | Ictère |            |            |         |          | Néphrose lipoidique |            |            |         |          |
|--------------------------|--------------|------------|------------|---------|----------|--------|------------|------------|---------|----------|---------------------|------------|------------|---------|----------|
|                          | S A          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ | S A    | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ | S A                 | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| $\text{SO}_3\text{Na}_2$ | 57,4<br>1)   | 13,8       | 2)<br>11,2 | 11,2    | 17,6     | 37,2   | 16,9       | 14,6       | 31,3    | 27,0     | 43,9                | 20,1       | 9,0        |         |          |
| Electro-<br>phorèse      | 58,5         | 4,0        | 11,5       | 7,8     | 18,2     | 38,5   | 7,0        | 11,5       | 15,5    | 27,5     | 25,0                | 2,5        | 45,0       | 17,5    | 10,0     |

1) Les chiffres représentent les pourcentages respectifs de chaque fraction. Dans la méthode au sulfite de ARDREY [3], les pourcentages ont été calculés à partir des quantités en gramme p. 1.000 de chacune des fractions protéiques dosées séparément.

2) Dans la méthode au sulfite, il n'est pas possible de subdiviser la fraction  $\alpha$  globulinique en sous-fractions  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  globulines.

mation de la configuration spatiale, sans hydrolyse des liaisons primaires covalentielles ». LOISELEUR [83 - 84] a montré que même de faibles températures ne dépassant pas  $+ 40^{\circ}$  amenaient une diminution importante dans le nombre de groupes basiques des protéines.

C'est pour éviter au maximum l'éventuelle altération à la température ambiante du laboratoire, que nous avons conservé les échantillons de sérum au froid à  $+ 4^{\circ}$  environ.

## 2) INFLUENCE DE LA CONSERVATION A LA GLACIERE

Nous avons voulu déterminer pendant combien de jours on pouvait entreposer des sérums à la glacière sans que l'on puisse déceler une variation dans la valeur du Nbt.

Dans ce but, trois sérums : le premier étant celui d'un enfant atteint de néphrose lipoïdique, les deux autres provenant d'enfants normaux, ont été examinés parallèlement ; de la sorte, nous pouvions observer une moindre stabilité éventuelle du sérum pathologique. Ces trois sérums ont été conservés au froid à  $+ 4^{\circ}$  pendant 40 jours. La valeur du Nbt a été déterminée respectivement le jour du prélèvement, après 8, 15 et 40 jours. Nous avons rassemblé les résultats dans le *tableau II*.

TABLEAU II

Influence de la conservation à la glacière sans addition d'antiseptiques sur la teneur en groupes basiques des protéines sériques

| Durée de conservation<br>(en jours) |   | 0           | 8    | 15    | 40    |
|-------------------------------------|---|-------------|------|-------|-------|
| Echantillons                        | 1 | (I)<br>89,5 | 89,5 | 94,5  | 99,5  |
|                                     | 2 | 129         |      | 135,5 | 143   |
|                                     | 3 | 113         | 113  | 116,5 | 123,5 |

(1) Les chiffres représentent la valeur de Nbt établie d'après le rapport P/N du précipité de phytate de protéine.

Nous pouvons observer qu'il est préférable de ne pas dépasser 8 jours de conservation avant d'effectuer la détermination du nombre de groupements basiques ionisables des protéines totales du sérum.

L'augmentation sensible après 15 jours de conservation peut être attribuée soit à un déplissement des liaisons peptidiques, soit à une protéolyse partielle par les enzymes sériques.

### 3) INFLUENCE DE L'HEMOLYSE

Certains échantillons nous étant parvenus légèrement hémolysés, nous n'avons pas pu les analyser. En effet, nous avons déterminé l'influence de la libération progressive d'hémoglobine sous l'action du froid.

Cinq sérums (A, B, C, D, E) ont été congelés à  $-20^{\circ}$  pendant 10 et 20 minutes à chaque essai, puis réchauffés de façon à provoquer l'hémolyse.

Les résultats des Nbt obtenus forment la matière du *tableau III*.

TABLEAU III  
Influence de l'hémolyse sur la teneur en phosphore  
du précipité acide phytique-protéines

| Valeur en Nbt                                                                            | Echantillons |     |     |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
|                                                                                          | A            | B   | C   | D   | E   |
| En séparant immédiatement le sérum du caillot                                            | I14          | I13 | I42 | I41 | I44 |
| Sang maintenu dix minutes à $-20^{\circ}$ puis réchauffé à la température du laboratoire | I45          | I30 | I51 | I48 | I45 |
| Sang placé 20 minutes à $-20^{\circ}$ puis réchauffé à la température du laboratoire     | I46          | I39 | I53 | I53 | I63 |

On pouvait s'attendre à une telle augmentation. En effet, l'hémoglobine est une histone, protéine très riche en groupements basiques. Une très faible quantité présente peut donc apporter de fortes variations dans les valeurs des Nbt.

En outre, à l'électrophorèse l'hémoglobine va perturber le « cliché » et la position d'hémoglobine entre les fractions  $\alpha$  et  $\beta$  globu-

lines amène une difficulté supplémentaire dans la décomposition en courbes de Gauss.

#### 4) . CONCLUSIONS

De façon à obtenir des résultats comparables, nous avons recueilli le sérum le plus tôt possible après le prélèvement sanguin. Nous l'avons toujours conservé au froid sans dépasser deux jours de conservation. En outre, nous avons rejeté tous ceux qui présentaient une trace d'hémolyse.

---

### CHAPITRE III

## ESSAIS PRELIMINAIRES

---

Les méthodes d'étude des protéines se sont considérablement améliorées au cours de ces dernières années. Ces progrès ont porté principalement sur les méthodes physiques : électrophorèse en cellule, ultra-centrifugation, biréfringence d'écoulement.

L'identification chimique des protéines n'a pas bénéficié de progrès aussi notables. La chromatographie sur papier ou sur colonne permet surtout de caractériser les amino-acides libérés dans un hydrolysat chimique ou enzymatique.

Pour la différenciation chimique des protéines, la méthode la plus courante demeure la précipitation fractionnée par les sels ou solvants organiques : relargage par les sulfates d'ammonium ou sodium, le sulfite de sodium, des tampons phosphatiques, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone ; ces méthodes améliorées sont encore l'objet de critiques.

Nous avons recherché si le dosage des groupements ionisés basiques par l'acide phytique (inositohexaphosphorique) pouvait être utilisé pour la caractérisation des protéines.

Ceci à une période où l'emploi des protéines en thérapeutique continue à se développer : hormones protéiques diverses, protéines plasmatiques totales ou fractionnées, et où l'on peut considérer que des tests chimiques relativement simples et pratiques font encore défaut.

#### I. — ÉTUDE DES COMBINAISONS DE L'ACIDE PHYTIQUE AVEC LES FRACTIONS PROTÉIQUES DU PLASMA

Dans leurs travaux, J.-E. COURTOIS et R. BARRÉ [9 - 13 - 14 - 33 - 34] ont signalé (ainsi que nous l'avons indiqué dans l'historique) que les diverses protéines qu'ils ont étudiées étaient suscep-

tibles de former des combinaisons avec les dérivés phosphorés ; mais les combinaisons les plus stables, les plus insolubles et également les plus riches en phosphore se forment avec l'acide phytique.

Tout se passe comme si l'acide phytique s'unissait par des liaisons salines entre ses six fonctions acides les plus fortes et les groupes basiques de la protéine. Cette salification provoquerait une agglomération et un repliement des séquences polypeptidiques autour du noyau cyclohexonique de l'acide phytique, ces modifications de la structure de la protéine s'accompagnant de son insolubilisation. La détermination du rapport phosphore total/azote total dans la combinaison insoluble acide phytique-protéine permet de calculer la proportion de groupes ionosés basiques Nbt dans la protéine d'un poids moléculaire arbitraire de  $10^6$ .

D'autre part, R. ARDRY, R. BARRÉ, J.-E. COURTOIS et J. STORCK [4 - 5] ont utilisé l'acide phytique pour étudier le blocage des groupes aminés dans les protéines plasmatiques bovines traitées par la formaldéhyde en vue de les spécifier.

Nous avons donc recherché :

1° La zone de pH dans laquelle la précipitation des protéines était totale et où la quantité de phosphore phytique fixé sur le précipité de phytate de protéine était maximum ;

2° Si dans le sérum sanguin les protéines étaient totalement précipitées par l'acide phytique, dans la zone de pH précédemment déterminée ;

3° Enfin en étudiant le rapport P/N, comparer les valeurs obtenues par l'acide phytique pour la détermination des groupes cationiques (basiques) : Nbt des protéines, et celles relevées dans la littérature.

#### 1) PRECIPITATION DES PROTEINES PLASMATIQUES EN FONCTION DU pH

Nous effectuons en double une série de précipitations phytiques (\*) dans lesquelles la quantité de ClH 0,2 N est comprise

---

(\*) Les quantités de protéines et de phytate de sodium utilisées sont celles indiquées dans nos méthodes analytiques. Avec des doses notablement supérieures d'acide phytique, les groupes phénoliques de la tyrosine de  $pK = 10,1$  interviennent dans la combinaison, qui est de ce fait plus riche en phosphore.

entre 0,1 ml et 5,0 ml, de façon à couvrir une gamme de pH allant de 7,0 à 1,0.

Après une heure de repos à la glacière, les précipités sont recueillis par centrifugation. Les liqueurs surnageantes servent à la détermination du pH et à la vérification de la précipitation totale des protéines par la réaction xantho-protéique [85].

Sur la première série de précipités nous procédons à la détermination de l'azote total selon la méthode de Kjeldahl et nous en déduisons le poids de protéines dans chacun des essais en multipliant la teneur en azote total du précipité par le coefficient habituellement utilisé de 6,25.

Les précipités de la deuxième série sont soumis à une minéralisation par chauffage avec un mélange sulfo-nitrique ; l'acide orthophosphorique libéré est tout d'abord précipité sous forme de sel ammoniaco-magnésien, ce dernier est recueilli par filtration et redissous dans l'acide nitrique dilué ; nous déterminons l'acide orthophosphorique par la méthode de Misson en utilisant le protocole opératoire de P. FLEURY et M. LECLERC [57].

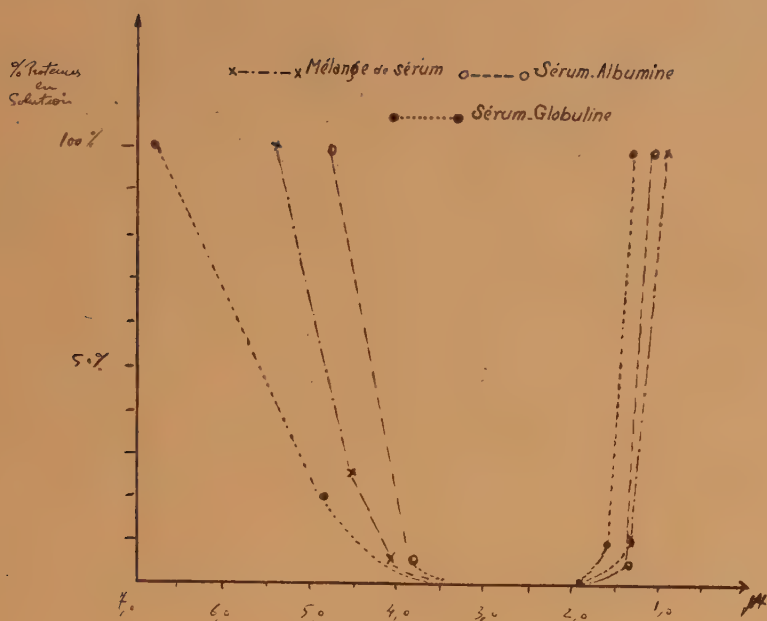
Nous exprimons les résultats en phosphore après avoir soustrait la teneur en phosphore de la quantité correspondante de protéine précipitée. Dans le cas de la sérum-albumine et de la sérum-globuline purifiées, cette correction s'avère inutile par suite de la très faible teneur en phosphore des échantillons utilisés ; la correction est indispensable avec le fibrinogène, qui renfermait 0,16 p. 100 de phosphore.

Nous avons réalisé des essais de pH 7,0 à pH 1,0 avec un mélange de sérums humains d'individus apparemment normaux, de la sérum-albumine et de la sérum-globuline (\*) ; les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes des *graphiques 1* et *2*.

Dans les trois séries d'essais, les courbes présentent la même allure générale que celles établies par R. BARRÉ et J.-E. COURTOIS [5 - 33 - 34] avec l'amando-albumine, l'amando-globuline, la légumine et l'insuline. En présence d'acide phytique, les protéines sériques commencent à s'insolubiliser pour un pH plus acide que 5,2 ; elles sont précipitées de façon complète entre pH 3,7-3,5 et pH 2,0-1,8 ; elles se redissolvent en milieu plus acide.

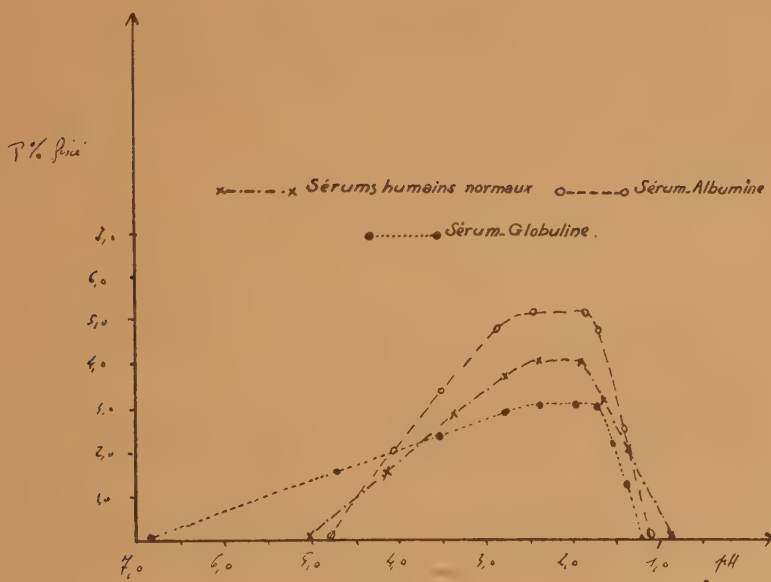
---

(\*) Nous exprimons nos plus vifs remerciements à MM. R. ARDRY et J. STORCK, du Centre de Transfusion de l'Armée, qui ont aimablement préparé à notre intention les diverses fractions de protéines plasmatiques utilisées au cours de nos recherches.



GRAPHIQUE I

Solubilité des protéines en présence d'acide phytique et en fonction du pH



GRAPHIQUE II

Proportion de phosphore phytique associé au précipité protéique en fonction du pH

## 2) PROPORTION DE PHOSPHORE FIXE SUR LE PRECIPITE PROTEIQUE EN FONCTION DU pH

Dans le précipité formé, la teneur en phosphore phytique augmente régulièrement avec l'acidité jusqu'à un pH voisin de 2,30  $\pm$  0,5, atteint son maximum dans une zone qui s'étend approximativement de 2,5 à 2,0. Le *graphique 2* représente la proportion de phosphore fixé en fonction du pH ; en deçà de pH 2,0 et au delà de pH 2,5, le taux du phosphore fixé décroît, il passe rapidement en solution avec la protéine.

## 3) DISCUSSION DES RESULTATS

Ces résultats paraissent pouvoir être interprétés de la même façon que pour les protéines végétales et l'insuline : en milieu plus acide que pH 4,5, les six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique sont progressivement libérées, comme l'ont montré les courbes de titration de cet acide établies par R. BARRÉ, J.-E. COURTOIS et G. WORMSER [15]; ces fonctions acides fortes contractent des liaisons salines avec les groupements basiques de la protéine, qui étaient primitivement libres ou qui viennent d'être déplacés à ces pH des liaisons contractées avec l'un des carboxyles des acides aspartique ou glutamique combinés dans la protéine.

La salification des groupements basiques par l'acide phytique s'accompagne de plissements et repliements des séquences polypeptidiques ; en effet, les groupes basiques viennent s'agglomérer par groupes de six autour du noyau cyclohexanique de l'acide phytique, noyau qui est vraisemblablement sous forme « chaise » [15]; c'est cette agrégation qui se traduit par une insolubilisation complète de la protéine. Lorsque l'acidité continue de croître, en dessous de pH 2,0, l'acide chlorhydrique vient se substituer plus ou moins complètement à l'acide phytique et la protéine repasse en solution.

La teneur maximum en phosphore phytique du précipité s'observe dans la zone où l'acide phytique s'est substitué complètement aux acides aspartique ou glutamique de la protéine avant d'être lui-même déplacé par l'acide chlorhydrique.

Ce mode de représentation, sans doute trop schématique, traduit les faits observés ; en réalité, pour la redissolution du précipité, il faudrait aussi tenir compte de l'ionisation totale des six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique en dessous de pH 2,0.

#### 4) RECHERCHES SUR LA PRECIPITATION COMPLETE DES PROTEINES SERIQUES PAR L'ACIDE PHYTIQUE

Nous avons comparé sur divers sérums humains la précipitation à pH  $2,30 \pm 0,5$ , des protéines par l'acide phytique, aux résultats obtenus à partir des mêmes sérums en utilisant les méthodes gravimétriques classiques ; nous avons eu recours aux deux techniques les plus usuelles dans les laboratoires français de chimie clinique : précipitation à la température du laboratoire par un mélange éthanol-acétone selon F. KAYSER [77], et thermocoagulation en présence d'éthanol selon P. FLEURY, J.-E. COURTOIS et R. EBERHARD [55 - 56]. Les résultats sont rassemblés dans le *tableau IV*.

TABLEAU IV

Précipitation des protéines sériques  
par l'acide phytique ou par les solvants organiques

(les chiffres du tableau expriment la teneur en protéine du sérum en g par litre)

| N° de l'échantillon | Précipitation par l'acide phytique | Précipitation par l'éthanol et l'acétone (à froid) | N° de l'échantillon | Précipitation par l'acide phytique | Précipitation par l'éthanol (à chaud) |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 1                   | 39,4                               | 42,0                                               | 6                   | 67,8                               | 69,0                                  |
| 2                   | 46,4                               | 49,5                                               | 7                   | 71,8                               | 73,0                                  |
| 3                   | 74,8                               | 76,0                                               | 8                   | 74,4                               | 75,0                                  |
| 4                   | 75,4                               | 74,0                                               | 9                   | 77,4                               | 79,0                                  |
| 5                   | 83,0                               | 85,0                                               |                     |                                    |                                       |

La précipitation par l'acide phytique fournit des valeurs légèrement inférieures (1,5 % en moyenne) à celles obtenues par thermocoagulation en présence d'éthanol. A l'exception d'un seul échantillon, les écarts sont nettement plus accentués entre les valeurs fournies par l'acide phytique et celles obtenues en utilisant l'éthanol-acétone comme agent précipitant.

En premier lieu, nous pouvons confirmer d'une façon indirecte que la précipitation par l'éthanol à l'ébullition fournit des résultats moins élevés que la précipitation à la température du laboratoire par

le mélange éthanol-acétone. P. FLEURY, J.-E. COURTOIS et R. EBERHARD [55] avaient obtenu des résultats similaires en comparant les résultats des deux méthodes de précipitation par les solvants organiques.

Nos essais ne permettent pas de déduire si l'écart observé entre les valeurs fournies par l'acide phytique ou l'éthanol à l'ébullition résulte soit d'un entraînement d'impuretés dans le précipité par l'éthanol, soit au contraire d'une précipitation incomplète de la protéine par l'acide phytique. La première éventualité apparaît être la plus probable ; en effet, le précipité par l'acide phytique se collecte aisément par centrifugation ; le liquide surnageant limpide ne paraît plus renfermer de protéines, car il ne se trouble pas par addition d'acide trichloracétique et ne fournit plus la réaction xanthoprotéique [85]. D'autre part, P. FLEURY, J.-E. COURTOIS et R. EBERHARD ont signalé [55] que la coagulation thermique en présence d'électrolytes et en milieu acide conduisent à des valeurs inférieures de 1 p. 100 environ à celles obtenues en précipitant par l'éthanol à l'ébullition.

Il apparaît donc que l'acide phytique a précipité complètement les albumines et globulines sériques sans entraîner d'autres constituants azotés du sérum.

#### 5) ETUDE DU RAPPORT P/N DANS LES PRECIPITES PROTEINES-ACIDE PHYTIQUE VALEURS DU Nbt

Nous avons déterminé ce rapport sur des précipités obtenus à  $\text{pH } 2,30 \pm 0,5$ , c'est-à-dire lorsque ce précipité atteint sa teneur maximum en phosphore.

Si l'on admet que chacune des six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique est liée à un groupement basique ionisable, nous pouvons calculer le nombre de ces groupements rapportés à une molécule protéique d'un poids conventionnel fixé à 100.000.

Nos essais ont porté sur la sérum-albumine, la sérum-globuline, le fibrinogène et les fractions  $\alpha_1$  et  $\beta$  lipoprotéines (fractions IV et III de Cohn).

Nous avons rassemblé dans le *tableau V* les résultats que nous avons obtenus avec la précipitation phytique et les valeurs proposées par différents auteurs et obtenues par titration potentiométrique en général.

Les valeurs obtenues par emploi de l'acide phytique sont en excellent accord avec celles obtenues par d'autres méthodes et que nous avons relevées dans la littérature.

R. BARRÉ et J.-E. COURTOIS [13] avaient déjà signalé que la technique à l'acide phytique et la titration potentiométrique conduisaient à des valeurs sensiblement identiques dans le cas de l'insuline, de l'amando-albumine et de l'amando-globuline.

TABLEAU V

Nombre de groupements azotés basiques ionisables : Nbt pour 10° g de protéine

| Nature de la protéine<br>d'origine humaine        | Valeur calculée d'après<br>la teneur en acide phy-<br>tique du précipité | Valeurs obtenues par<br>d'autres méthodes<br>d'après HAUROWITZ (66)<br>et TRISTRAM (128) |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sérum-albumine                                    | I46                                                                      | I42                                                                                      |
| Sérum-globuline                                   | I02                                                                      | I00                                                                                      |
| Fibrinogène                                       | I23                                                                      | I25                                                                                      |
| $\alpha_1$ lipoprotéines<br>(fraction IV de COHN) | II3                                                                      |                                                                                          |
| $\beta$ lipoprotéines<br>(fraction III de COHN)   | I07                                                                      |                                                                                          |

Il résulte de ces comparaisons avec six protéines différentes d'origine animale ou végétale que l'emploi de l'acide phytique constitue une méthode simple et pratique de détermination des groupes basiques ionisables d'une protéine.

Cette détermination peut être proposée comme test d'identification d'une protéine, car il existe de nettes différences entre les fractions protéiques.

L'examen du tableau V montre, en effet, que les diverses fractions du plasma se classent d'après leurs richesses en groupements basiques dans l'ordre progressif suivant :

1° Mélange de diverses sérum-globulines.

2°  $\beta$  lipoprotéines, échantillon contenant 6 % de sérum-albumine, 5 % de  $\alpha$  globuline, 68 % de  $\beta_1$  lipoprotéines, 16 % de  $\beta_2$  lipoprotéines, 5 % de  $\gamma$  globulines et fibrinogène.

3°  $\alpha_1$  lipoprotéine, échantillon constitué de 9 % de sérum-albumine, 60 % d' $\alpha$  globuline, 26 % de  $\beta$  globuline, 0,4 % de  $\gamma$  globuline, et 4,4 % de cholestérol.

4° Fibrinogène.

5° Sérum-albumine.

## II. — APPLICATIONS ANALYTIQUES POSSIBLES DE L'ACIDE PHYTIQUE A L'IDENTIFICATION DES PROTÉINES

Nous avons pu constater que la précipitation par l'acide phytique permet de différencier qualitativement les fractions protéiques et même éventuellement de les doser.

Parmi les diverses applications possibles de la précipitation phytique, nous en avons retenu trois qui paraissent présenter un intérêt dans l'analyse des médicaments :

a) L'étude de la dénaturation du fibrinogène au cours de la conservation ;

b) L'essai d'une préparation commerciale injectable de  $\gamma$  globulines ;

c) L'étude de la conservation de solutés protéiques formolés, buvables, du commerce.

### 1) ETUDE DE LA DENATURATION DU FIBRINOGENE

Une solution de fibrinogène humain a été conservée à une température de  $+4^{\circ}$  environ, elle est devenue progressivement opalescente, cette dénaturation s'accompagne d'une libération de groupements ionisés basiques pour un poids moléculaire conventionnel de 100.000. Le fibrinogène fraîchement préparé renfermait 123 groupes ionisés basiques déterminés d'après le rapport P/N du précipité par l'acide phytique. Après sept jours de conservation, le nombre des groupes ionisés basiques s'est élevé à 155 et après un mois à 166. Il apparaît ainsi possible d'étudier la dénaturation d'après l'augmentation du nombre de groupes ionisés basiques.

### 2) ETUDE D'UNE $\gamma$ GLOBULINE COMMERCIALE

Les essais furent réalisés avec diverses ampoules de 3 cm<sup>3</sup> d'une préparation commerciale française actuellement utilisée dans les Hôpitaux de Paris ; cette préparation portait sur l'étiquette : « Gamma-globuline humaine d'origine placentaire 0,10 g par centimètre cube ». Nous y avons dosé 20 mg par ml de chlorures exprimés en ClNa ; les protéines sont associées à d'autres constituants azotés de plus

faible poids moléculaire : mg de N total par ml 21 à 22, selon les échantillons, mg de N protéique précipité par l'acide trichloracétique 11,5 à 14,0 selon les échantillons, ce qui correspond à 72 à 87,5 mg de protéines par ml.

Le précipité a été soumis à une électrophorèse sur papier de pH 8,65 (tampon au véronal), ce qui permet de déceler cinq composants ; le principal correspond à 91 p. 100 des protéines totales et migre comme les fractions  $\gamma$  globuliniques du sérum, il est précédé par trois petites fractions migrant plus rapidement et dont la somme représente moins de 0,5 p. 100 des protéines totales ; une dernière fraction migrant plus lentement que la fraction principale correspond à environ 9 p. 100 des protéines totales.

1 ml de préparation de gamma-globuline est additionné de 1 ml de phytate de sodium M/20 en acide phytique, 3,3 ml de ClH N/5 et 14,7 ml d'eau distillée.

Après séjour de une heure à la glacière, le précipité formé est recueilli par centrifugation, il renferme selon les échantillons de 11 à 13 mg d'azote total, soit 68,8 à 81,2 mg de protéines. Le liquide surnageant précipite par repos à la glacière, ce qui n'avait jamais été observé jusqu'ici avec les autres protéines étudiées [9 - 13 - 33 - 34]. Si on laisse reposer 24 heures à la glacière avant de centrifuger, le précipité renferme 13,1 mg d'azote, ce qui correspond à 81,5 mg de protéines.

La détermination du rapport P/N dans les précipités nous a permis de calculer le nombre de groupes ionisés basiques rapportés à un poids moléculaire conventionnel de 100.000. Avec la précipités collectés après séjour de une heure à la glacière, nous avons obtenu respectivement 96, 98, 99 et 105 groupes basiques. Les liquides surnageants ont été placés 1 h 30 à la glacière, les précipités formés correspondaient à 96 et 100 groupes basiques. Enfin, lorsque l'on laisse en contact 24 heures à la glacière avant de centrifuger, le précipité correspond à 95 groupes basiques. La proportion des groupes basiques dans les divers précipités est assez voisine de la valeur 100 obtenue par titration potentiométrique de la sérum-globuline TRIS-TRAM [128]. Les fractions précipitables par l'acide phytique présentent donc ce caractère chimique des gamma-globulines.

Il apparaît plus difficile d'interpréter la précipitation progressive par l'acide phytique ; après vingt-quatre heures, ce réactif a précipité sensiblement la même quantité de protéines que l'acide trichloracétique. Il paraît intéressant de signaler qu'après une heure de contact l'acide phytique a insolubilisé environ 90 % des protéines précipitables, soit immédiatement par l'acide trichloracétique, soit après

vingt-quatre heures par l'acide phytique. Ce chiffre est très voisin de la proportion de la fraction principale déterminée par électrophorèse sur papier. Il est possible d'envisager que la fraction qui se sédimente le plus lentement en présence d'acide phytique correspond à celle qui a migré le plus lentement par électrophorèse. Comme nous n'avons pu déceler de telles fractions dans les sérums normaux, il y a lieu de supposer qu'il s'agit d'un produit de dénaturation de la gamma-globuline.

### 3) CONSERVATION DE DIVERS SOLUTES PROTEIQUES FORMOLÉS DU COMMERCE

Nous avons étudié certaines propriétés chimiques et physico-chimiques de quatre variétés de sérums formolés. Trois étaient des sérums de bovidés, le quatrième était un sérum d'équidé.

Ces sérums avaient été formolés à 0,8 p. 1.000, répartis en ampoules et chauffés à + 56°.

Sur des lots anciens et nouveaux, nous avons appliqué la précipitation phytique en pH acide comme pour les essais précédents.

Nous avons comparé les rapports P/N obtenus avec les sérums recueillis par simple coagulation du sang prélevé à la jugulaire, et ceux obtenus avec le produit préparé d'après des dates plus ou moins éloignées.

Nous avons effectué en parallèle le dosage des protides totaux par thermocoagulation [55], précipitation par l'alcool acétone à froid [77], la précipitation par l'acide trichloracétique à 20 %, ainsi que la précipitation phytique.

Nous avons pu constater qu'en plus des concordances de nos résultats et des valeurs proposées par J.R. EDWARDS [42] ou celles relevées dans le « Standard values in blood » [121], les diverses techniques utilisées nous amenaient aux mêmes observations que dans le cas des sérums humains.

1° La thermocoagulation par l'éthanol fournit des valeurs moins élevées que la précipitation par l'alcool-acétone sans chauffage [77].

2° A la température du laboratoire, l'acide trichloracétique et l'alcool-acétone donnent des précipités ayant des poids assez voisins.

3° La thermocoagulation par l'éthanol donne un poids de précipité correspondant légèrement supérieur à la quantité de protéines évaluées d'après la teneur en azote total du précipité.

4° Par contre, les taux de protéines évaluées d'après la teneur en azote total des précipités sont dans le même ordre de grandeur

que l'agent précipitant soit l'éthanol à l'ébullition, l'acide trichloracétique ou l'acide phytique à la température du laboratoire.

Ces faits pourraient laisser supposer que le coefficient 6,25 permettant de relier le taux de protéines à l'azote total est trop faible. Le coefficient de 6,25 a en effet été établi pour les protéines du sérum humain (teneur en azote pour 100 de sérum-albumine) 15,95 ; pour 100 de  $\beta$  globuline 14,84 ; pour 100 de  $\gamma$  globuline 16,03).

TABLEAU VI

Récapitulation des différentes protidémies des sérums de bovidés et équidés

| (2)     | <u>a</u>                                                            | <u>b</u>                                   | <u>c</u>                                                             | <u>d</u>                                                       | <u>e</u>                                                 | <u>f</u>                                                   |
|---------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Sérums  | Précipitation par l'éthanol acétone à la température du laboratoire | Précipitation par l'éthanol à l'ébullition | D'après la teneur en azote du précipité par l'éthanol à l'ébullition | Précipitation trichloracétique à la température du laboratoire | D'après la teneur en azote du précipité trichloracétique | D'après la teneur en azote du précipité phytique à pH 2,30 |
|         | —<br>Gravimétrie                                                    | —<br>Gravimétrie                           |                                                                      | —<br>Gravimétrie                                               |                                                          |                                                            |
|         | (1)                                                                 |                                            |                                                                      |                                                                |                                                          |                                                            |
| Taureau | 63,50                                                               | 58,50                                      | 55,85                                                                | 63,00                                                          | 54,50                                                    | 55,75                                                      |
| Génisse | 64,00                                                               | 59,00                                      | 55,60                                                                | 64,50                                                          | 55,50                                                    | 55,50                                                      |
| Veau    | 70,00                                                               | 67,50                                      | 63,00                                                                | 74,50                                                          | 63,00                                                    | 62,00                                                      |
| Cheval  | 73,00                                                               | 69,25                                      | 65,75                                                                | 73,50                                                          | 64,50                                                    | 65,50                                                      |

(1) Les chiffres du tableau correspondent avec les taux de protéines évalués en g par litre.

(2) Les sérums nous ont été envoyés par M. GELEBART, comme n'ayant subi aucun traitement. Dès leur obtention, ils ont été expédiés au laboratoire sans que la température ambiante dépasse  $\pm 10^\circ$  et ils ont été aussitôt soumis à l'analyse.

Nous avons déjà observé que la thermocoagulation par l'éthanol, suivie de gravimétrie, ne fournissait que des valeurs faiblement supérieures à celles déduites du taux d'azote total du précipité par l'acide phytique. Ces écarts sont plus accentués dans les quatre sérums d'animaux examinés.

Lorsque l'on détermine la teneur en azote total des protéines, il serait donc plus logique d'exprimer les résultats en poids d'azote que de rapporter à un poids de protéines à l'aide d'un coefficient variant selon l'espèce et le rapport des fractions protéiques du sérum.

Enfin, dans le *tableau VII*, nous rapportons les variations des groupes basiques en fonction de l'âge des échantillons de sérums formolés.

Après formolage et suivant la quantité employée, il y aura plus ou moins de groupes aminés transformés en groupes méthyléniques qui ne pourront plus alors fixer d'acide phytique.

TABLEAU VII  
Variations du nombre de groupements cationiques basiques  
au cours du vieillissement de sérums formolés

| Sérums  | non formolés | Formolés à 0,8 p.1000 et chauffés à + 56° |       |       |
|---------|--------------|-------------------------------------------|-------|-------|
|         |              | de 2 semaines à<br>6 mois                 | 4 ans | 5 ans |
| Taureau | 133 (1)      | 100                                       | 99    | 122   |
| Génisse | 125          | 110                                       | 107   | 124   |
| Veau    | 127          | 100                                       | 100   | 127   |
| Cheval  | 122          | 102                                       | 105   | 142   |

(1) Les chiffres représentent le nombre de groupes basiques pour 10<sup>5</sup> g de protéines.

La dénaturation ménagée des protéines a été suivie par le Centre de Transfusion de l'Armée [6] et R. ARDRY, R. BARRÉ, J.-E. COURTOIS et J. STORCK [5].

A un premier stade, vers + 40°, il y a méthylénisation. Puis entre + 55° et 65°, on constate la réapparition de groupes basiques, sans doute due à un clivage analogue à celui observé dans le sérum formolé chauffé à + 57°, par une scission des ponts peptidiques liant entre elles les chaînes polypeptidiques principales des molécules (ponts hydrogènes).

On observe une peptisation aux températures de 60° à + 80°, ce qui se traduit par une diminution des groupes cationiques. Mais entre + 70° et + 80°, on assiste à un clivage intramoléculaire amenant une libération plus ou moins grande de groupes cationiques.

Enfin, avec la cyclisation, les protéines perdent leur structure originelle.

La diminution des groupes basiques qui apparaît dans les produits formolés, diminution voisine de 15 à 20 %, est en accord avec les données des auteurs précédemment cités et J. LOISELEUR [83 - 84].

Nous pouvons noter une stabilité dans le rapport P/N pendant un certain temps. Comme le font remarquer J. ENSELME et J. TIGAUD [44], la chaleur exerce sur une protéine formolée son action propre habituelle dénaturante, mais elle favorise aussi une stabilisation. Puis après cinq années, on remarque une augmentation du rapport P/N qui semble indiquer une simple hydrolyse.

Dans le cas du sérum d'équidé, l'augmentation est plus sensible. Il est possible de l'attribuer à un début de dénaturation des protéines.

### III. — CONCLUSIONS

Les essais préliminaires nous ont permis d'observer :

— La précipitation totale par l'acide phytique des protéines sériques en pH acide : pH 2,20 à 2,40.

— Que la combinaison acide phytique-protéines est la plus riche en phosphore à pH  $2,30 \pm 0,5$ .

— Qu'il est possible de différencier les fractions protéiques du plasma et de calculer d'après le rapport P/N le nombre des groupes basiques des protéines (Nbt).

— Qu'il est en outre possible d'envisager l'étude de la conservation de différentes préparations pharmaceutiques de protéines.

---

## CHAPITRE IV

### APPLICATION AU SÉRUM SANGUIN HUMAIN

---

Les essais préliminaires nous ont permis d'appliquer directement la méthode à l'acide phytique aux protéines totales du sérum sanguin. Nous avons pu montrer que l'acide phytique (I.H.P.) utilisé dans la proportion de 0,5mg de phosphore phytique pour 1,5 mg d'azote protéique précipite intégralement à  $\text{pH } 2,30 \pm 0,5$  les albumines et globulines, sans entraîner d'autres constituants azotés du sérum. Nous avons observé que le simple dosage de l'azote et du phosphore total du précipité I.H.P.-protéine permettait de calculer le nombre de groupements aminés basiques Nbt pour  $10^5$  g de protéines.

Parallèlement, le rapport albumines/globulines déterminé par électrophorèse sur papier nous permet de calculer le Nbc.

Nous avons déterminé alors le nombre de groupes basiques des protéines totales du sérum de nombreux sujets apparemment en bonne santé : chez de jeunes enfants, dans le sang du cordon ombilical, chez des sujets adultes et chez des vieillards ; en outre, nous avons recherché si un effort physiologique violent (accouchement) ou le séjour dans une atmosphère raréfiée en oxygène (hautes altitudes) pouvaient amener des variations importantes dans la valeur des Nbt.

Nous avons effectué ces différentes séries de déterminations dans le but de rechercher les valeurs moyennes du Nbt. Connaissant les valeurs normales du Nbt, nous pouvions éventuellement envisager l'étude du Nbt dans différentes affections.

Avant d'aborder l'étude des différents sérums, nous précisons que le terme « Sérums normaux » désigne les sérums de sujets apparemment en bonne santé lors du prélèvement sanguin. Cette dénomination nous a paru pratique pour l'opposer à « Sérums pathologiques », sérums de sujets atteints de différentes affections, que nous avons étudiés par la suite.

# I. — SÉRUMS DE SUJETS PRÉSUMÉS NORMAUX

## 1) SERUMS D'ENFANTS

Dans une première série d'essais, nous avons déterminé le Nbt et Nbc chez de jeunes enfants présumés normaux. Ces enfants avaient été hospitalisés à l'Hôpital Bretonneau, non pour maladie, mais pour fractures diverses (jambe ou bras). Leur état physiologique étant bon, nous les avons considérés comme « normaux » au point de vue protides sanguins.

TABLEAU VIII

Groupes basiques des protéines sériques d'enfants de 3 à 10 ans présumés normaux

| Echantillons<br>N° | Age du<br>sujet<br>(en<br>années) | Sexe   | Protidémie<br>(en g.p.<br>litre) | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>le rap-<br>port<br>Albumines<br>Globulines | Nbt<br>calculé<br>d'après<br>la teneur<br>en azote<br>et phos-<br>phore du<br>précipité |
|--------------------|-----------------------------------|--------|----------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|----------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |                                   |        |                                  | Albumines                            | Globulines |            |         |          |                                                                         |                                                                                         |
|                    |                                   |        |                                  |                                      | $\alpha$ 1 | $\alpha$ 2 | $\beta$ | $\gamma$ |                                                                         |                                                                                         |
| I                  | 5                                 | ♂      | 72,0                             | 53,0                                 | 8,0        | 10,0       | 10,0    | 19       | 122                                                                     | 123                                                                                     |
| 2                  | 3                                 | ♂      | 69,0                             | 61,0                                 | 5,0        | 7,0        | 9,0     | 18,0     | 126                                                                     | 123                                                                                     |
| 3                  | 10                                | ♀<br>+ | 81,0                             | 62,5                                 | 7,0        | 8,5        | 10,0    | 12,0     | 126                                                                     | 113                                                                                     |
| 4                  | 3                                 | ♂      | 70,0                             | 60,0                                 | 3,0        | 8,0        | 13,0    | 16,0     | 125                                                                     | 124                                                                                     |
| 5                  | 6                                 | ♀<br>+ | 72,0                             | 62,0                                 | 6,0        | 9,0        | 11,0    | 12,0     | 126                                                                     | 120                                                                                     |

Nous avons rassemblé les résultats obtenus au *tableau VIII*.

Nous pouvons observer que la protidémie et que les différents résultats protéiques fournis par l'électrophorèse sont en accord avec les valeurs généralement admises ENSELME, STÉPANOVITCH [43 - 122].

En outre, les valeurs du Nbt et Nbc sont pratiquement identiques. Le sexe ne semble pas apporter de modifications. A l'exception du cas n° 3, les différences entre le Nbt et Nbc ne dépasse pas 5 p. 100.

## 2) SANG DU CORDON OMBILICAL

N'ayant pas pu obtenir du sérum de nouveau-né, nous avons utilisé du sang prélevé à partir de cordon ombilical de nouveau-né à la Maternité de l'Hôpital Bretonneau.

Nous précisons qu'il s'agit de sujets de race blanche.

Nous avons étudié cinq sérums différents. Nous ne pouvons pas placer les résultats obtenus sur le même échelon de comparaison que pour les sérums d'enfants ou de nouveaux-nés. Il s'agit en effet d'un sang spécial: sang maternel et sang de l'enfant se trouvent mélangés. Néanmoins, d'après les résultats rassemblés au *tableau IX* nous pouvons observer que les pourcentages des fractions protéiques sont en rapport avec les valeurs relevées dans la littérature ROYER [111], WALLON [131].

TABLEAU IX

Groupes basiques des protéines sériques dans le sang du cordon ombilical

| Echantillons<br>N° | Protéines<br>totales<br>(en g. par<br>litre) | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         | Nbc<br>calculé<br>d'après le<br>rapport<br>Albumines/<br>Globulines | Nbt<br>calculé<br>d'après la<br>teneur en<br>azote et<br>phosphore<br>du<br>précipité |          |
|--------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|                    |                                              | Albumines                            | Globulines |            |         |                                                                     |                                                                                       |          |
|                    |                                              |                                      | $\alpha 1$ | $\alpha 2$ | $\beta$ |                                                                     |                                                                                       | $\gamma$ |
| 6                  | 70                                           | 36                                   | 8          | 14         | 16      | 26                                                                  | 114                                                                                   | 121      |
| 7                  | 52                                           | 44                                   | 9,5        | 10,5       | 9,5     | 26,5                                                                | 118                                                                                   | 107      |
| 8                  | 68                                           | 48                                   | 8          | 9          | 14      | 21                                                                  | 120                                                                                   | 124      |
| 9                  | 55                                           | 52                                   | 11         | 11         | 12      | 14                                                                  | 122                                                                                   | 122      |
| 10                 | 49                                           | 60                                   | 6,5        | 6,5        | 12      | 15                                                                  | 125                                                                                   | 115      |

Les différences entre Nbt et Nbc sont peu élevées, mais cependant sensiblement plus importantes que dans les essais précédents (*tableau VIII*). Cependant les valeurs de Nbt sont voisines de celles observées chez des sérums de jeunes enfants. L'essai n° 7 est le seul où l'on note un Nbt de 107. Malgré la différence de constitu-

tion du sang du cordon ombilical avec le sang d'un enfant ou de la mère, nous pouvons observer une certaine similitude dans les valeurs du Nbt, et à cause même de cette différence physiologique, il nous a paru intéressant de déterminer les Nbt.

### 3) SERUMS DE SUJETS ADULTES

Nous avons poursuivi nos déterminations du nombre de groupements basiques en étudiant des sérums de sujets adultes.

Nous avons déterminé les Nbc et Nbt chez trois hommes et deux femmes présumés normaux (\*).

Les résultats sont rassemblés dans le *tableau X*.

TABLEAU X

Groupes basiques des protéines sériques de sujets adultes présumés normaux

| Echantillons<br>N° | Age du<br>sujet<br>(en<br>années) | Sexe   | Protidémie<br>(en g.p.<br>litre) | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         |        | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>le rap-<br>port<br>Albumines<br>Globulines | Nbt<br>calculé<br>d'après<br>la teneur<br>en azote<br>phore du<br>précipité |
|--------------------|-----------------------------------|--------|----------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|--------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
|                    |                                   |        |                                  | Albumines                            | Globulines |            |         |        |                                                                         |                                                                             |
|                    |                                   |        |                                  |                                      | $\alpha$ 1 | $\alpha$ 2 | $\beta$ | $\tau$ |                                                                         |                                                                             |
| 11                 | 22                                | ♂      | 85,0                             | 53,0                                 | 4,0        | 6,0        | 15,0    | 22,0   | I22,0                                                                   | I24,0                                                                       |
| 12                 | 50                                | ♂      | 72,0                             | 58,0                                 | 4,0        | 9,0        | 11,0    | 18,0   | I24,0                                                                   | I23                                                                         |
| 13                 | 27                                | ♂      | 72,0                             | 58,5                                 | 4,0        | 11,5       | 8,0     | 18,0   | I25                                                                     | I21                                                                         |
| 14                 | 30                                | ♀<br>+ | 70,0                             | 60,0                                 | 3,0        | 7,0        | 14,0    | 16,0   | I25                                                                     | I25                                                                         |
| 15                 | 52                                | ♀<br>+ | 75,0                             | 64,0                                 | 3,0        | 9,0        | 10,0    | 14,0   | I27                                                                     | I21                                                                         |

Comme dans le cas des sérums d'enfants, on peut remarquer que la différence entre les valeurs du Nbt et Nbc est minime. Dans l'essai n° 15 où elle est maximum, elle est cependant inférieure à 5 p. 100. Les résultats fournis par l'électrophorèse sont en rapport.

(\*) Les sérums d'adultes étudiés sont ceux du personnel de la pharmacie et du laboratoire de l'Hôpital Bretonneau. Nous tenons à leur exprimer toute notre gratitude.

avec ceux relevés dans la littérature [43]. L'âge et le sexe semblent n'apporter aucune modification à la teneur en groupes basiques des protéines totales du sérum.

#### 4) SERUMS DE VIEILLARDS

Nous avons cependant voulu observer si un âge avancé n'apportait pas de variations sensibles dans la valeur du Nbt. Nous avons calculé les valeurs du Nbt et Nbc sur les sérums de cinq vieillards (\*), dont l'âge variait de 72 à 85 ans. Seul l'essai n° 20 porte sur le sérum d'un homme âgé de 79 ans. Les autres essais sont des sérums de femmes.

Les internes en Médecine, qui nous obligeamment fourni ces différents sérums, nous ont indiqué qu'il s'agissait de vieillards en bonne santé.

TABLEAU XI

Groupes basiques des protéines sériques de vieillards en bonne santé

| Echantillons<br>N° | Age du<br>sujet<br>(en<br>années) | Sexe | Protidémie<br>en g. p.<br>1000 ml | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         |        | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>le rap-<br>port<br>Albumines<br>Globulines | Nbt<br>calculé<br>d'après<br>la teneur<br>en azote<br>et phos-<br>phore du<br>précipité |
|--------------------|-----------------------------------|------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|--------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |                                   |      |                                   | Albumines                            | Globulines |            |         |        |                                                                         |                                                                                         |
|                    |                                   |      |                                   |                                      | $\alpha$ 1 | $\alpha$ 2 | $\beta$ | $\tau$ |                                                                         |                                                                                         |
| 16                 | 72                                | ♀    | 76,5                              | 56,0                                 | 7,5        | 8,5        | 15,5    | 12,5   | 123,5                                                                   | 137,5                                                                                   |
| 17                 | 85                                | ♀    | 71,7                              | 50,0                                 | 3,0        | 7,0        | 16,0    | 24,0   | 121                                                                     | 123                                                                                     |
| 18                 | 83                                | ♀    | 66,7                              | 50,0                                 | 3,5        | 12,0       | 14,5    | 20,0   | 121                                                                     | 132                                                                                     |
| 19                 | 85                                | ♀    | 73,0                              | 55,0                                 | 4,0        | 9,0        | 12,0    | 20,0   | 123                                                                     | 126                                                                                     |
| 20                 | 79                                | ♂    | 76,5                              | 52,0                                 | 3,5        | 9,5        | 12,0    | 23,0   | 122                                                                     | 124                                                                                     |

La valeur du Nbt est un peu plus élevée que pour les enfants et les adultes. Dans les essais nos 17, 19 et 20, le Nbt est identique aux valeurs de Nbt déjà trouvées chez les sérums d'adultes ou d'en-

(\*) Vieillards de l'Institution Sainte-Perrine.

fants. Dans l'essai n° 18, on observe une légère augmentation :  $Nbt = 132$ . Dans le cas n° 16, l'augmentation est plus importante :  $Nbt = 137,5$ .

Alors que chez les enfants et les adultes les valeurs de  $Nbt$  oscillent de 120 à 125, avec les sérums de vieillards les valeurs de  $Nbt$  sont un peu plus élevées, elles vont de 125 à 130, et même au delà.

On peut également observer que chez le vieillard la « formule » protéique est différente de celle de l'adulte et l'écart avec le protidogramme des enfants est encore plus notable.

Dans les cinq essais effectués sur des sérums de vieillards, on peut observer une diminution du pourcentage de la sérum-albumine, des globulines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , une teneur sensiblement identique en  $\beta$ -globulines, mais par contre une élévation assez importante du taux des  $\gamma$ -globulines.

#### 5) VARIATIONS DU $Nbt$ CHEZ LE MEME SUJET

Avant d'aborder une série d'examens sur des sérums pathologiques, il nous a paru nécessaire de nous assurer que chez un sujet

TABLEAU XII

Détermination de la valeur du  $Nbt$  au moment d'un accouchement

| Echantillons<br>N° | Prélèvements        |            |                                      |     |                                    |     |
|--------------------|---------------------|------------|--------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
|                    | au début du travail |            | immédiatement après<br>la délivrance |     | deux heures après<br>la délivrance |     |
|                    | (1)<br>Nbc          | (2)<br>Nbt | Nbc                                  | Nbt | Nbc                                | Nbt |
| 27                 | 113                 | 113        | 113                                  | 109 | 114                                | 124 |
| 28                 |                     | 111        | 117                                  | 112 | 117                                | 117 |
| 29                 | 114                 | 117        | 114                                  | 120 | 114                                | 117 |
| 30                 | 115                 | 120        | 115                                  | 119 | 114                                | 120 |
| 31                 | 117                 | 123        | 114                                  | 118 |                                    | 118 |

(1) Nbc est calculé à partir du rapport  $SA/SG$ .

(2) Nbt est trouvé à partir de la teneur en azote et phosphore du précipité.

sain, le Nbt demeurait stable et n'était pas perturbé par un effort physiologique violent. M. FRANÇOIS, Assistant à la Maternité de l'Hôpital Bretonneau, a pu nous procurer des sangs prélevés lors des diverses phases de l'accouchement : au début du travail, immédiatement après la délivrance, et deux heures après la délivrance. Les sérums sont ceux de femmes de race blanche.

Les résultats rassemblés au *tableau XII* permettent de constater deux faits principaux :

1° En tenant compte de la limite de précision des déterminations, les valeurs de Nbc et Nbt sont très voisines. Nous pouvons ainsi confirmer nos résultats antérieurs : chez des sujets bien portants on note rarement plus de 5 à 10 pour cent d'écart entre les valeurs de Nbc et Nbt.

2° Il est en outre possible de constater que les valeurs de Nbt et Nbc demeurent pratiquement constantes au cours des diverses phases de l'accouchement.

#### 6) SÉRUMS DE SUJETS AYANT SEJOURNE PLUSIEURS MOIS EN HAUTE ALTITUDE

Nous avons pu compléter cette série d'essais sur des sérums « normaux » par l'étude du Nbt après un séjour de plusieurs mois en atmosphère raréfiée et pauvre en oxygène.

Le Commandant P. BIGET, Chef de Laboratoire de Physiologie à l'Armée de l'Air, nous a aimablement fait parvenir des sérums de sujets recueillis à leur retour d'expédition, après un séjour en haute montagne : sérums d'alpinistes entraînés en vue d'une expédition dans l'Himalaya.

Nous pouvons observer (*tableau XIII*) que le taux des protides totaux est légèrement inférieur à celui des sérums d'adultes (*tableau X*).

Les pourcentages respectifs de chaque fraction protéique diffèrent légèrement de ceux des sujets normaux (*tableau X*).

Très légère baisse du pourcentage de la sérum-albumine et des  $\gamma$ -globulines, stabilité de la fraction  $\alpha_2$ -globuline, mais par contre, augmentation assez importante des pourcentages des  $\alpha_1$  et  $\beta$ -globulines.

Néanmoins, les valeurs de Nbc ne sont pas modifiées dans l'ensemble. On peut observer que les valeurs de Nbt et Nbc sont de même ordre de grandeur que celles précédemment trouvées avec les sérums de sujets normaux (*tableau X*).

**TABLEAU XIII**  
Groupes azotés basiques  
de sujets ayant passé plusieurs mois en haute altitude (1)

| Echantillons<br>N° | Protidémie<br>en g. p.<br>1000 ml. | Pourcentage des fractions protéiques (2) |            |      |      |      | Nbc                                                         | Nbt                                                                         |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------------|------------|------|------|------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
|                    |                                    | Albumines                                | Globulines |      |      |      | calculé<br>d'après<br>le rapport<br>Albumines<br>Globulines | calculé<br>d'après<br>la teneur<br>en azote et<br>phosphore<br>du précipité |
|                    |                                    |                                          | α 1        | α 2  | β    | γ    |                                                             |                                                                             |
| 21                 | 69,0                               | 59,0                                     | 11,0       | 10,0 | 10,0 | 10,0 | I25                                                         | I22,5                                                                       |
| 22                 | 72,5                               | 41,0                                     | 8,0        | 13,0 | 17,0 | 21,0 | I16,5                                                       | I25,5                                                                       |
| 23                 | 69,0                               | 46,0                                     | 4,0        | 7,0  | 22,0 | 21,0 | I19                                                         | I22,5                                                                       |
| 24                 | 67,0                               | 55,0                                     | 6,5        | 11,0 | 19,0 | 8,5  | I23                                                         | I26                                                                         |
| 25                 | 70,5                               | 51,0                                     | 7,0        | 10,0 | 19,0 | 13,0 | I21,5                                                       | I23,5                                                                       |
| 26                 | 66,5                               | 49,0                                     | 7,0        | 9,0  | 23,0 | 12,0 | I20,5                                                       | I27                                                                         |

- (1) Sérums de sujets revenant d'une expédition en haute altitude.  
 (2) Electrophorèses effectuées par le Commandant BIGET, qui nous a aimablement communiqué ses résultats et les différents sérums sur lesquels nous avons pu déterminer les Nbt.

**TABLEAU XIII bis**  
Moyennes des résultats obtenus avec des sérums de sujets normaux

| Sérums                                       | Protidémie<br>en g. p.<br>1000 ml. | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         |          | Nbc | Nbt |
|----------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|----------|-----|-----|
|                                              |                                    | S A                                  | Globulines |            |         |          |     |     |
|                                              |                                    |                                      | $\alpha$ 1 | $\alpha$ 2 | $\beta$ | $\sigma$ |     |     |
| Jeunes enfants                               | 70,9                               | 60,0                                 | 5,5        | 8,5        | 10,6    | 15,4     | I25 | I20 |
| Adultes                                      | 75,5                               | 60,0                                 | 3,8        | 8,2        | 11,0    | 17,0     | I25 | I23 |
| Vieillards                                   | 73,0                               | 53,0                                 | 4,0        | 9,1        | 14,0    | 19,9     | I23 | I29 |
| Adultes après<br>séjour en<br>haute altitude | 69,0                               | 51,0                                 | 7,0        | 10,0       | 18,0    | 14,0     | I22 | I25 |

## 7) DISCUSSION DES RESULTATS

Le premier trait caractéristique est la constance du Nbc. En effet, il est voisin de 125 pour les sérums d'enfants et adultes (*tableaux VIII et X*). Il présente une valeur moyenne un peu plus faible : 123 et 122 avec les sérums de vieillards (*tableau XI*) et les sujets ayant été en haute altitude (*tableau XII*).

D'autre part, les valeurs du Nbt sont très voisines, mais présentent une petite différence entre elles suivant les sujets examinés.

Nous avons rassemblé dans le *tableau XII bis* les moyennes obtenues avec les résultats des différents sujets étudiés et classés en fonction de l'âge. Nous y avons adjoint les cas particuliers des adultes en bonne santé et revenant de la haute montagne.

Nous pouvons observer que la valeur moyenne de Nbt est de 120 pour les jeunes enfants, qu'elle passe à 123 pour les adultes et atteint 129 pour les vieillards. Par contre, avec les sérums « d'alpinistes », la valeur de Nbt redescend à 125.

Pour une même valeur de Nbc on observe des différences assez notables des Nbt. Mais ces écarts ne dépassent jamais 10 p. 100. Nous n'avons observé qu'un seul cas où l'écart était voisin de 9,6 pour 100 (essai n° 3, *tableau VIII*). Dans tous les autres cas les écarts sont égaux ou inférieurs à 5 pour 100.

On peut remarquer également (*tableau XIII bis*) que dans deux cas le Nbt est inférieur au Nbc : sérums de jeunes enfants et d'adultes ; et que dans les deux autres cas : vieillards et « montagnards » le Nbt est supérieur au Nbc.

Bien que la valeur de Nbc soit presque toujours la même dans ces différents essais, le pourcentage de chaque fraction protéique subit des variations assez importantes.

C'est ainsi qu'avec un taux de sérum-albumine voisin de 60 p. 100 (sérums de jeunes enfants et de sujets adultes) les valeurs de Nbc sont identiques et légèrement supérieures au Nbt.

Par contre, une augmentation des globulines, augmentation que l'on peut appeler « physiologique » (il s'agit bien de sujets en bonne santé) et voisine de 15 p. 100 se traduit par une baisse légère du Nbc et cette valeur est inférieure à celle du Nbt.

On note une élévation du pourcentage des  $\gamma$ -globulines avec les sérums de vieillards étudiés. Ce sont les globulines  $\beta$  qui augmentent dans le sérum des « montagnards ».

Il paraît intéressant de noter qu'une diminution du pourcentage de la sérum-albumine amène en corollaire une valeur de Nbt supérieure à Nbc et réciproquement.

Il semble que le Nb moyen que nous avons donné à l'ensemble des fractions globuliniques ne soit peut-être pas en concordance parfaite avec ce qu'il devrait être. En effet, nous avons trouvé pour les globulines étudiées (en fait il s'agissait de  $\gamma$ -globulines) un Nbt 100.

La fraction  $\gamma$  étant la plus importante des fractions globuliniques du sérum, nous avons admis que le Nbt de l'ensemble des fractions globuliniques serait égal à 100. Ceci étant admis, et connaissant le Nbt de la sérum-albumine, il nous était possible de calculer Nbc.

Cette valeur a été admise d'une façon empirique. Elle doit être dans la réalité un peu différente (nous verrons aux chapitres suivants les valeurs respectives des Nb de chacune des fractions protéiques). Néanmoins, cette valeur de 100 est proche de la valeur réelle moyenne, puisque les écarts entre Nbc et Nbt sont égaux ou le plus souvent inférieurs à 5 p. 100. Nous n'avons trouvé qu'un seul essai où l'écart observé était voisin de 9,6 p. 100.

Nous considérerons cependant que nos essais sur les divers groupes de sujets sont trop peu nombreux pour en tirer des déductions très générales.

Nous en retiendrons cependant que dans l'ensemble, chez les sujets normaux, quel que soit l'âge les écarts entre les valeurs de Nbc et Nbt ne dépassent pas 10 p. 100. Il nous semble donc possible de penser que des écarts supérieurs à 10 p. 100 seront le fait de sérums pathologiques.

## II. — SÉRUMS PATHOLOGIQUES

Il ressort de l'étude de près d'une trentaine de sérums de sujets présumés normaux que le Nbt des protéines totales du sérum est sensiblement voisin de 125.

Au cours de nos recherches, nous avons étudié de nombreux sérums pathologiques au fur et à mesure de notre « approvisionnement ». Nous les avons ensuite classés en quatre groupes :

- 1) Affections hépatiques.
- 2) Maladies infectieuses et parasitaires.
- 3) Affections tumorales.
- 4) Affections rénales.

Nous étudierons successivement chacun de ces groupes.

Nous avons fixé les bases suivantes pour les commentaires divers dans la suite des essais :

- Ecart modéré entre Nbc et Nbt : 10 à 20 pour 100 ;
- Ecart accentué entre Nbc et Nbt : 20 à 40 pour 100 ;
- Ecart très accentué entre Nbc et Nbt : > 40 pour 100 ;
- Ecart particulièrement significatif : Nbt < 100 ;  
Nbt > 143.

## 1) AFFECTIONS HEPATIQUES

L'étude chimique des affections hépatiques entraîne dans un champ d'exploration à la fois vaste et imprécis. La participation du foie aux actes physiologiques les plus variés explique cette richesse et cette diffusion.

Nous placerons la cirrhose alcoolique au début de notre étude. Elle présente en effet un substrat histologique bien défini ; elle fournit une base précise de discussion. En outre, son évolution délimitée en deux temps et cela de façon nette par l'apparition de l'ascite, se séparent ainsi des formes curables que l'on peut appeler légères, qui sont anascitiques et des formes graves, incurables qui sont ascitiques.

L'ictère, considéré comme une autre expression de la dégénérescence hépatique, sera étudié ensuite. Dans le deuxième paragraphe, nous pourrons le comparer à l'ictère à virus.

### a) CIRRHOSSES ALCOOLIQUES

La cirrhose est la coexistence anatomique :

- 1° d'une hyperplasie du collagène aboutissant à une sclérose cicatricielle ;
- 2° d'une hépatite diffuse parenchymateuse avec dégénérescence atrophique ou graisseuse.

A côté des cirrroses éthyliques atrophiques (de Laënnec) ou hypertrophiques, ascitiques ou anascitiques, nous avons placé deux cirrroses, ayant pour cause une cardiopathie, à titre comparatif.

— Au début de l'intoxication éthylique ou lorsque cette dernière est bien supportée, des modifications discrètes apparaissent : abaissement léger des albumines, faible augmentation des globulines. La protidémie est sensiblement normale (LIOT [81]).

— Dans un second groupe, l'hépatomégalie, souvent importante, apparaît accompagnée de modifications physiologiques et biochimiques plus importantes : chute du taux des albumines, augmentation

TABLEAU XIV

Variations du Nbt dans les sérums cirrhotiques d'alcooliques

| Echantillons<br>no | Affections                                | Protidé-<br>mie en<br>g.p.1000 | Pourcentage des fractions<br>protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>d'après<br>SA/SG<br>électro-<br>phorèse | Nbt<br>d'après<br>N et P<br>du pré-<br>cipité |
|--------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------|---------|----------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                    |                                           |                                | Albu-<br>mines                          | Globulines |            |         |          |                                                |                                               |
|                    |                                           |                                |                                         | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                |                                               |
| 27                 | Ethylisme peu accentué                    | 71,5                           | 42,0                                    | 5,0        | 10,0       | 17,5    | 22,5     | I17                                            | I28                                           |
| 28                 | Ethylisme peu accentué                    | 68,0                           | 48,0                                    | 7,0        | 11,0       | 14,0    | 20,0     | I20                                            | I13                                           |
| 29                 | Cirrhose hypertrophique<br>sans ascite    | 76,5                           | 43,0                                    | 7,5        | 12,5       | 21,0    | 16,0     | I18                                            | I19                                           |
| 30                 | " " "                                     | 68,20                          | 45,0                                    | 6,0        | 10,5       | 15,5    | 23,0     | I19                                            | I14                                           |
| 31                 | " " "                                     | 77,2                           | 41,0                                    | 7,5        | 12,5       | 19,0    | 20,0     | I17                                            | I10                                           |
| 32                 | " " "                                     | 67,5                           | 38,0                                    | 7,5        | 12,5       | 18,5    | 23,5     | I16                                            | I05                                           |
| 33                 | " " "                                     | 73,0                           | 46,0                                    | 8,0        | 12,0       | 18,0    | 26,0     | I19                                            | I06                                           |
| 34                 | " " "                                     | 76,5                           | 32,0                                    | 3,5        | 6,5        | 20,0    | 38,0     | I13                                            | 93                                            |
| 35                 | " le même après 1 mois<br>de traitement   | 70,5                           | 38,0                                    | 10,0       | 11,5       | 16,0    | 24,5     | I16                                            | I10                                           |
| 36                 | Ethylisme chronique                       | 74,0                           | 51,0                                    | 3,0        | 10,0       | 17,0    | 19,0     | I21                                            | I36                                           |
| 37                 | " "                                       | 73,0                           | 49,0                                    | 6,0        | 9,5        | 16,5    | 19,0     | I20                                            | I40                                           |
| 38                 | " "                                       | 77,0                           | 54,0                                    | 3,5        | 8,5        | 14,0    | 20,0     | I23                                            | I41                                           |
| 39                 | " "                                       | 74,5                           | 53,0                                    | 5,5        | 13,0       | 11,0    | 17,5     | I22                                            | I42                                           |
| 40                 | " "                                       | 87,5                           | 56,5                                    | 5,5        | 9,0        | 11,0    | 18,0     | I23                                            | I53                                           |
| 41                 | Cirrhose atrophique avec<br>ascite        | 62,5                           | 35,0                                    | 7,0        | 18,0       | 17,0    | 23,0     | I14                                            | I35                                           |
| 42                 | " " "                                     | 70,0                           | 44,0                                    | 6,0        | 15,0       | 15,5    | 19,5     | I19                                            | I61                                           |
| 43                 | Cirrhose hypertrophique<br>cardiopathique | 65,5                           | 49,0                                    | 6,0        | 11,0       | 17,0    | 17,0     | I20                                            | I72                                           |
| 44                 | " " "                                     | 86,0                           | 40,0                                    | 12,5       | 12,5       | 10      | 25       | I17                                            | 244                                           |

des  $\alpha$ ,  $\beta$  et surtout des  $\gamma$  globulines. La protidémie tend à s'élever légèrement.

— Un troisième groupe correspond aux cirrhoses constituées, identifiées du point de vue chimique et accompagnées ou non d'ascite. Baisse des albumines, retour vers la normale des  $\alpha$  globulines et augmentation des  $\beta$  et  $\gamma$  globulines. Augmentation de la protidémie, qui atteint et peut même dépasser 85 g. p. 1.000, mais avec des irrégularités très grandes.

— Enfin, un quatrième groupe est constitué par des malades, dont la protidémie est très basse et dont l'évolution est particulièrement grave.

Nous avons rassemblé au *tableau XIV*, 18 essais portant sur des sérums de cirrhotiques à différents stades.

Les résultats électrophorétiques paraissent en accord avec ceux de très nombreux auteurs qui ont étudié les variations électrophorétiques dans les cirrhoses (ABLOT, BENHAMOU, BONNET DE LA TOUR [1 - 2 - 18 - 19]).

Les échantillons 27 et 28 sont ceux d'éthylisme faiblement accentué. Les valeurs de Nbt sont sensiblement égales à la normale ou légèrement inférieures.

Par contre, l'abaissement du Nbt est très accentué avec les essais suivants (n<sup>os</sup> 29 à 35). On assiste en effet à un engorgement graisseux du foie. Un abaissement très net des albumines et en corollaire une augmentation des globulines.

L'éthylisme chronique au contraire (n<sup>os</sup> 36 à 40) montre une augmentation assez importante du Nbt, variations de 136 à 153.

Enfin, les essais n<sup>os</sup> 41 et 42 représentent un stade irréversible et grave de la cirrhose : on assiste à une augmentation très accentuée des Nbt.

Il apparaît possible d'émettre l'hypothèse suivante : dans les stéatoses accompagnant l'éthylisme chronique où la proportion de sérum-albumine est plus élevée (Nbc supérieur à 120), l'atteinte hépatique pourrait éventuellement se traduire par la synthèse d'albumines plus riches en groupes basiques que les albumines sériques normales.

Dans les autres cas d'hépatomégalie, la diminution importante de la sérum-albumine accentuerait la baisse du Nbt.

Enfin, dans les stades plus graves et plus avancés, les cellules hépatiques, ainsi que les cellules du S.R.E. du foie et du pancréas, pourraient répondre d'une façon anarchique par la synthèse de protéines anormales entraînant des Nbt plus élevés. Ces différents essais

représentent plus un sondage qu'une étude systématique. Une telle étude devrait porter sur un plus grand nombre de cas suivis pendant une certaine durée en liaison avec la clinique.

## b) HÉPATITES

Nous avons étudié trois sérums de sujets atteints d'hépatite.

L'hépatite se présente comme une altération du parenchyme hépatique. Il y a ictère par obstruction des voies biliaires extra-hépatiques.

TABLEAU XV  
Variations du Nbt dans l'hépatite

| Echantillons<br>N° | Protidémie<br>g. p.<br>1000 | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>d'après<br>SA/SG<br>électro-<br>phorèse | Nbt<br>d'après<br>N et P<br>du pré-<br>cipité |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|----------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                    |                             | Albumines                            | Globulines |            |         |          |                                                |                                               |
|                    |                             |                                      | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\sigma$ |                                                |                                               |
| 45                 | 72,0                        | 31,0                                 | 13,0       | 21,0       | 14,0    | 21,0     | 113                                            | 98                                            |
| 46                 | 70,0                        | 40,0                                 | 12,5       | 12,5       | 14,0    | 21,0     | 117                                            | 87                                            |
| 47                 | 77,0                        | 45,0                                 | 8,0        | 12,0       | 14,0    | 21,0     | 119                                            | 105                                           |

D'après les résultats rassemblés au *tableau XV*, il est possible de constater que les taux de protéines totales sont toujours moins abaissées que dans les cirrhoses. L'abaissement des albumines est assez important, et l'augmentation des  $\gamma$  globulines est sensible [18].

Il est en outre assez intéressant de comparer les valeurs trouvées pour les Nbt avec celles obtenues dans les cirrhoses hypertrophiques.

L'atteinte du parenchyme hépatique assure dans les deux cas une diminution sensible des albumines et en corollaire la diminution importante des Nbt au-dessous de 100 ; cet abaissement semble indiquer dans ces deux affections une synthèse d'albumines anormales.

En outre, il est à noter que par des techniques de sédimentation et de diffusion, P.A. CHARLWOOD [28] a trouvé des poids moléculaires différents pour des sérums-albumines extraites de sérums de sujets atteints de différentes affections hépatiques.

## 2) MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES

Nous avons réuni dans ce groupe plusieurs affections ayant des causes différentes : virus, bactéries et un cas de leishmaniose infantile.

Dans les infections à virus, nous avons étudié l'ictère à virus ou hépatite épidémique infectieuse. Dans les affections bactériennes, nos essais ont porté particulièrement sur le rhumatisme articulaire aigu, septicémie post-abortionum, deux méningites, une à streptocoques, l'autre à bacille de Koch, enfin un abcès froid tuberculeux.

### a) ICTÈRES A VIRUS

L'ictère à virus ou hépatite épidémique, se comporte comme un ictère par obstruction des voies biliaires intra-hépatiques.

Nous avons étudié neuf sérums. Trois (n<sup>os</sup> 48, 44, 50) portent au début d'une affection. Les essais n<sup>os</sup> 51, 52 et 53 sont ceux de sujets différents à la période d'état, décelable physiologique : « jaunisse ». Enfin, d'autres sujets ont permis d'étudier l'évolution de l'hépatite lors du traitement (n<sup>os</sup> 54, 55, 56).

La protidémie tend à être élevée. Les modifications de l'électrogramme sont proches de l'insuffisance hépatique grave. Le fait prédominant est l'augmentation des globulines  $\gamma$ , assez facilement explicable, puisqu'il s'agit d'une infection. On observe en outre un fort abaissement de la teneur en sérum-albumine, qui doit être en relation avec l'insuffisance hépatique.

Les résultats que nous rapportons dans le *tableau XVI* montrent ces différentes variations en rapport avec ceux observés par L. HARTMANN [67] et de l'ensemble des nombreux auteurs qui ont étudié cette affection (CHARBONNIER [26], RULLIÈRE [113]).

### *Différenciation de l'hépatite à virus de l'hépatite par obstruction*

Nous pouvons observer que dans les trois sérums étudiés (45 à 47) les Nbt de l'hépatite sont voisins de 100 et même légèrement inférieurs. Ils semblent marquer une atteinte du parenchyme hépatique, incapable de synthétiser une sérum-albumine normale.

Au contraire, dans l'hépatite à virus, les Nbt sont fortement élevés. Nous verrons d'ailleurs que, dans les différentes affections bactériennes que nous avons étudiées, les valeurs du Nbt tendent à augmenter également ; c'est pour cette raison que nous pouvons proposer

le test à l'acide phytique pour identifier la nature d'un ictère. La différence entre les taux permet de remarquer qu'avec un électrophorégramme sensiblement identique deux valeurs sont augmentées dans l'hépatite épidémique : la protidémie et le Nbt.

Sans vouloir présenter ce test comme absolument différentiel, il nous a paru assez caractéristique pour le mentionner.

TABLEAU XVI  
Groupes basiques des protéines sériques dans des ictères à virus

| Echantillons<br>N° | Evolution de l'affection | Protidémie<br>g.p.<br>1000ml. | Pourcentage des protéines sériques |            |            |         |          | Nbc<br>d'après<br>SA/SG<br>obtenu<br>à l'électrophorèse | Nbt<br>d'après<br>N et P<br>déterminé sur le précipité |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------|------------|---------|----------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                    |                          |                               | Albumines                          | Globulines |            |         |          |                                                         |                                                        |
|                    |                          |                               |                                    | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                         |                                                        |
| 48                 | Début                    | 78                            | 38,0                               | 7,0        | 16,0       | 16,0    | 23,0     | I16                                                     | I27                                                    |
| 49                 | Début                    | 71                            | 40,0                               | 10,0       | 12,0       | 16,0    | 22,0     | I17                                                     | I29                                                    |
| 50                 | Début                    | 75                            | 51                                 | 6,0        | 14,0       | 13,0    | 16,0     | I21                                                     | I30                                                    |
| 51                 | Période d'état           | 70                            | 46,0                               | 11,0       | 12,0       | 12,0    | 19,0     | I19                                                     | I58                                                    |
| 52                 | " "                      | 73,5                          | 49,0                               | 10,0       | 11,0       | 12,0    | 18,0     | I20                                                     | I63                                                    |
| 53                 | " "                      | 70,0                          | 51,0                               | 4,5        | 9,5        | 11,0    | 24,0     | I21                                                     | I64                                                    |
| 54                 | Après traitement         | 83,0                          | 34,0                               | 9,0        | 10,0       | 18,0    | 23,0     | I14                                                     | I19                                                    |
| 55                 | " "                      | 76,5                          | 33,0                               | 8,0        | 16,5       | 13,5    | 29,0     | I14                                                     | I29                                                    |
| 56                 | " "                      | 75,0                          | 53,0                               | 3,5        | 9,5        | 12,0    | 22,0     | I22                                                     | I27                                                    |

.../...

## b) RHUMATISME ARTICULAIRE AIGU

Nous avons étudié six sérums de jeunes garçons d'une douzaine d'années atteints de rhumatisme articulaire aigu et hospitalisés à l'Hôpital Bretonneau. Ces six sérums (n°s 57 à 62) sont ceux de sujets différents, mais prélevés à des époques différentes de l'affection. Les résultats ont été rassemblés dans le *tableau XVII*.

Nous pouvons observer que la sérum-albumine est diminuée de façon précoce et persistante [104]. L'augmentation du groupe des

$\alpha$  globulines est également en accord avec les données de différents auteurs (BADIN [8], EFFERSOE [45]).

L'augmentation des mucoprotéines est sensible dans cette affection. Elles paraissent appartenir principalement au groupe  $\alpha_2$  globuline [97 - 108].

TABLEAU XVII

Variations du Nbt des protéines sériques dans le rhumatisme articulaire aigu

| Echantillons<br>N° | Evolution de<br>l'affection                  | Proti-<br>démie<br>en g.p.<br>1000 ml | Pourcentage des fractions protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>le rap-<br>port SA/<br>SG obtenu<br>par élec-<br>trophorèse | Nbt<br>trouvé<br>d'après<br>P/N du<br>précipi-<br>té |
|--------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                    |                                              |                                       | Albumi-<br>nes                       | Globulines |            |         |          |                                                                                          |                                                      |
|                    |                                              |                                       |                                      | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                                                          |                                                      |
| 57                 | A la période<br>de crise                     | 56,0                                  | 37,0                                 | 6,5        | 20,5       | 11,5    | 24,5     | 115                                                                                      | 163                                                  |
| 58                 | " " " "                                      | 84,0                                  | 41,0                                 | 7,5        | 17,5       | 14,5    | 19,5     | 117                                                                                      | 160                                                  |
| 59                 | En cours de<br>traitement                    | 62,0                                  | 40,0                                 | 8,0        | 19,0       | 14,0    | 19,0     | 117                                                                                      | 135                                                  |
| 60                 | " " " "                                      | 67,5                                  | 40,0                                 | 7,5        | 20,0       | 10,0    | 22,5     | 117                                                                                      | 135                                                  |
| 61                 | En fin de trai-<br>tement conva-<br>lescence | 72,0                                  | 43,5                                 | 6,0        | 20,0       | 14,5    | 16,0     | 118                                                                                      | 135                                                  |
| 62                 | Convalescence                                | 72,8                                  | 58,0                                 | 4,1        | 10,5       | 11,9    | 15,5     | 124                                                                                      | 114                                                  |

Les  $\beta$  globulines semblent inchangées [43]. Les globulines ne sont augmentées que dans des proportions moyennes [73].

Le Nbc est sensiblement constant au cours de l'évolution de la maladie. A la fin de la convalescence (n° 62), l'électrophorégramme et le Nbc sont revenus à la normale.

Par contre, les valeurs enregistrées pour les Nbt sont très différentes des Nbc ; mais elles présentent entre elles un signe de continuité.

A la période de crise, on observe un écart particulièrement significatif du Nbt (163-160) (n°s 57 et 58), puis au fur et à mesure de l'évolution de la maladie vers la guérison, la valeur du Nbt décroît.

A la fin de la convalescence (n° 62), nous avons même enregistré une baisse inférieure à la valeur moyenne normale (Nbt 114).

Dans cette affection, nous pouvons observer une élévation du nombre de groupements cationiques, qui paraît suivre la gravité de l'affection.

c) AFFECTIONS BACTÉRIENNES DIVERSES ET UN CAS DE KALA-AZAR

Nous avons comparé les valeurs respectives des Nbc et Nbt obtenues sur le sérum de sujets atteints de différentes affections bactériennes et dans un cas de Kala-Azar infantile.

TABLEAU XVIII

Valeur comparées de Nbt et Nbc dans quelques sérums de sujets atteints d'affections bactériennes et un cas de Kala-Azar

| Echantillons<br>N° | Nature et évolution<br>de l'affection          | Nbc | Nbt |
|--------------------|------------------------------------------------|-----|-----|
| 63                 | Septicémie à perfringens suivie<br>de mort     | 123 | 176 |
| 64                 | " " " " "                                      | 120 | 157 |
| 65                 | " " " " "                                      | 121 | 138 |
| 66                 | Méningite à streptocoque suivie<br>de guérison | 114 | 143 |
| 67                 | Méningite à bacille de Koch                    | 127 | 160 |
| 68                 | Abcès froid tuberculeux                        | 122 | 144 |
| 69                 | Kala-Azar infantile                            | 119 | 171 |

Dans le *tableau XVIII*, nous avons rassemblé les résultats obtenus avec trois sérums de septicémie à perfringens à évolution fatale (n°s 63, 64, 65), deux sérums de sujets atteints de méningite : à streptocoque (n° 66) suivie d'une guérison ultérieure, à bacille de Koch (n° 67). Un sérum dans le cas d'un abcès froid tuberculeux (n° 68) et enfin (n° 69) un sérum de Kala-Azar.

D'emblée les valeurs de Nbt sont très élevées : 140, 160, 176. L'écart entre Nbc et Nbt est très accentué. Les écarts les plus grands (n<sup>os</sup> 63 et 69) sont voisins de 40 p. 100 en plus de la valeur normale du Nbt (125).

Nous devons cependant noter que le perfringens est protéolytique et qu'il est possible d'envisager que la libération d'acides aminés est à l'origine de l'élévation du nombre de groupes basiques.

Des expériences effectuées chez le rat avec un streptocoque doré ont montré l'augmentation d'acides aminés libres (TERRANOVA [125]).

Avec les variations enregistrées au cours du rhumatisme articulaire aigu, les variations obtenues avec les affections bactériennes ou parasitaires semblent les plus élevées.

### 3) AFFECTIONS TUMORALES

Nous avons poursuivi nos déterminations des groupes cationiques (basiques) des protéines totales du sérum en effectuant quelques sondages avec diverses affections tumorales.

Nous avons réuni dans un même chapitre les tumeurs malignes : épithéliomas et sarcomes, avec une place à part pour la maladie de Kahler. Nous avons placé au *tableau XIX* un cas de maladie d'HAND-SCHULLER CHRISTIAN.

#### a) EPITHÉLIOMAS DIVERS

Dans la première partie du *tableau XIX*, nous avons relevé différentes valeurs de Nbt obtenues avec des épithéliomas. Ce sont des épithéliomas malpighiens : tumeurs malignes des cellules épithéliales, en général du larynx, de la cavité buccale, ou de la langue.

Plusieurs de ces malades ont pu être suivis pendant quelques mois au cours de l'évolution de la maladie ou vers la guérison.

Les chiffres marqués *bis*, *ter*, etc. représentent le même sujet au cours de l'évolution de l'affection.

Nous pouvons observer qu'au début de la maladie les valeurs de Nbt sont franchement abaissées (n<sup>os</sup> 70, 71, 72, 74, 78). Puis au fur et à mesure de l'influence de la radiothérapie ou curiethérapie, on peut observer une élévation progressive du Nbt (70 *bis*, 71 *bis*, 72 *bis*, 73 *bis*, 75 *bis*, 75 *ter*, 75 *qto*).

Différents auteurs (B. JIRGENSON et J.A. COOPER [75 - 76]) ont montré la présence d'albumines et de globulines anormales dans les sérums de sujets atteints d'affections tumorales.

TABLEAU XIX

Teneurs en groupes basiques des protéines sériques dans quelques affections tumorales

| Echantil-<br>lons N° | Nature de l'affection et<br>évolution                                        | Protides en g.p.<br>1000 ml. | <u>Nbc</u><br>d'après le rapport<br>SA/SG obtenu à<br>l'électrophorèse | <u>Nbt</u><br>d'après le<br>P/N trouvé sur<br>le précipité |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 70                   | Epithélioma de la langue<br>avant traitement                                 | 72,5                         | II5                                                                    | 97                                                         |
| 70 bis               | Le même après deux mois de<br>curithérapie                                   |                              | II2                                                                    | I28                                                        |
| 71                   | Epithélioma de la langue<br>avant traitement                                 | 71,0                         | II5                                                                    | 99                                                         |
| 71 bis               | Le même après deux mois de<br>curithérapie                                   | 72,0                         | I25                                                                    | I46                                                        |
| 72                   | Epithélioma de la langue tout<br>au début du traitement                      | 69,0                         | II8                                                                    | 81                                                         |
| 72 bis               | Le même après un mois de R.X<br>et curithérapie                              |                              | II7                                                                    | I35                                                        |
| 73                   | Epithélioma du larynx avant<br>tout traitement                               | 62,5                         | I22                                                                    | I01                                                        |
| 73 bis               | Le même ayant subi une abla-<br>tion, mais pas de curithérapie               |                              | I22                                                                    | I23                                                        |
| 74                   | Epithélioma du larynx avant<br>traitement                                    | 71,0                         | II9                                                                    | 89                                                         |
| 75                   | Epithélioma du larynx et de<br>la trachée, non traité                        | 76,5                         | II8                                                                    | II0                                                        |
| 75 bis               | Le même après un mois de<br>curithérapie                                     | 66,0                         | II5                                                                    | I27                                                        |
| 75 ter               | Le même après opération, sui-<br>vi d'une nette amélioration                 | 70,0                         | I20                                                                    | II0                                                        |
| 75queto              | Le même sujet, deux mois après<br>l'opération, entièrement guéri             |                              | I21                                                                    | I28                                                        |
| 76                   | Epithélioma de la bouche et de<br>l'oesophage en cours de radio-<br>thérapie | 72,5                         | II4                                                                    | II6                                                        |
| 76 bis               | Le même deux mois après traite-<br>ment suspendu, nette améliora-<br>tion    | 63,5                         | II9                                                                    | I28                                                        |
| 77                   | Epithélioma de l'épiglotte en<br>cours de radiothérapie                      | 69,0                         | I20                                                                    | I32                                                        |
| 78                   | Epithélioma des bronches avant<br>traitement                                 | 74,5                         | I20                                                                    | 94                                                         |
| 79                   | Sarcome de l'amygdale en<br>évolution                                        | 65,0                         | I24                                                                    | I29                                                        |
| 80                   | Lympho-sarcome au début chez<br>un enfant de 12 ans                          | 83,0                         | I20                                                                    | I35                                                        |
| 81                   | Maladie d'HAND SCHULLER<br>CHRISTIAN                                         | 51,5                         | I31                                                                    | I61                                                        |

Il n'est pas impossible de supposer que si dès le début de l'affec-  
tion nous ayons enregistré des valeurs de Nbt inférieures à 100, la  
radiothérapie débobinant ensuite des protéines expliquerait la remon-  
tée des Nbt.

Enfin, nous pouvons observer qu'un traitement chirurgical pré-  
coce (n<sup>os</sup> 73 bis, 74 ter, 75 qto) ramène le Nbt à une valeur normale :  
123-128.

La maladie d'Hand-Schuller-Christian (n<sup>o</sup> 81) que nous avons pla-  
cée dans ce même *tableau XIX*, est surtout une maladie métabolique  
(dyslipoiïdose). C'est une accumulation de stériles dans le tissu réti-  
culo-endothélial. Nous l'avons placée dans ce tableau, car elle est  
à la limite des processus néoplasiques (cette place est d'ailleurs très  
discutée).

La valeur élevée du Nbt = 161 confirme sa place en dehors des  
maladies néoplasiques.

### b) MALADIE DE KAHLER

Nous avons étudié trois sarcomes nés aux dépens des tissus héma-  
topoïétiques : deux  $\gamma$  myélomes et un  $\beta$  myélome.

La maladie de Kahler a fait l'objet de multiples recherches.

Nous avons eu l'occasion d'étudier trois sérums de sujets atteints  
de cette affection.

Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans le *tableau XX*.

TABLEAU XX

Valeurs comparées des Nbc et Nbt dans le myélome multiple des os

| Echantillons<br>N° | Nature du KAHLER | Protidé-<br>mie en<br>g <sub>±</sub> p.<br>1000 ml. | Pourcentage des fractions<br>protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>le rapport<br>SA/SG obte-<br>nu à l'é-<br>lectrophorèse | Nbt<br>trouvé<br>d'après<br>P/N du<br>préci-<br>pité de<br>phytate<br>de pro-<br>téine |
|--------------------|------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------|---------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |                  |                                                     | Albumi-<br>nes                          | Globulines |            |         |          |                                                                                      |                                                                                        |
|                    |                  |                                                     |                                         | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                                                      |                                                                                        |
| 82                 | $\beta$ myélome  | 112,0                                               | 35,0                                    | 8,0        | 9,0        | 48,0    | -        | 115                                                                                  | 113                                                                                    |
| 83                 | $\gamma$ myélome | 123,5                                               | 20,0                                    | 4,5        | 5,0        | 4,5     | 66,0     | 108                                                                                  | 103                                                                                    |
| 84                 | $\gamma$ myélome | 131,0                                               | 21,0                                    | 4,0        | 7,0        | 8,0     | 60,0     | 109                                                                                  | 118                                                                                    |

L'essai n° 82 est un  $\beta$  myélome. La rareté de cette affection est connue [37]. Certains ont voulu en faire un groupe particulier. L'augmentation de la fraction globulinique ne serait pas une  $\beta$  globuline, aussi ils l'appellent  $\Delta$ zéta myélome [91].

Néanmoins, les résultats obtenus pour les valeurs du Nbt sont sensiblement équivalentes pour ces trois cas : Nbt = 113, 103, 108.

Les pourcentages électrophorétiques sont identiques à ceux relevés dans la littérature (ENSELME [43], PAGET [95]).

Nous ne donnons ces résultats qu'à titre indicatif. Le test à l'acide phytique ne nous permet pas d'intervenir dans les discussions nombreuses sur la nature des protéines dans cette affection.

#### 4) AFFECTIONS RENALES

Nous avons étudié deux affections rénales : la néphrose lipoïdique et la néphrite.

Nous précisons que les sujets atteints de néphrose lipoïdique ne présentaient pas de néphrite associée.

##### a) NÉPHROSE LIPOÏDIQUE

Nos essais ont porté sur 5 sujets différents à différentes époques de l'affection.

Le degré de l'affection se manifeste en plus des signes cliniques comme l'œdème, par une protéinurie abondante. Nous avons toujours observé le taux de la protéinurie. Nous l'avons rapporté dans les *tableaux XXI* et *XXI*. Nous pouvons constater qu'effectivement avec une protéinurie élevée l'état du patient s'aggravait.

Le Nbt est nettement différent non seulement des valeurs moyennes obtenues, mais encore du Nbc.

La crise aiguë se manifeste par un écart particulièrement significatif de la valeur du Nbt : Nbt = 94 (n° 85); 96 (n° 85 *ter*); 96,5 (n° 86 *ter*); 90 (pour l'essai n° 88).

Au fur et à mesure que l'état du sujet s'améliore, la protéinurie s'abaisse et les valeurs de Nbt remontent vers 100 tout d'abord, puis petit à petit vers la valeur normale 125 et même la dépassent légèrement.

Les variations de Nbt observées, abaissement au moment de la crise, remontée ensuite, se présentent d'une façon identique à celles des autres affections.

TABLEAU XXI

Variations des groupes aminés basiques des protéines sériques  
dans la néphrose lipidique

| Echantillons<br>N° | Evolution de<br>l'affection                                                              | Protidé-<br>mie en<br>g. p.<br>1000 ml. | Pourcentage des fractions<br>protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>SA/SG<br>par<br>électro-<br>phorèse | Nbt<br>trouvé<br>d'après<br>P/N du<br>préci-<br>pité |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------|---------|----------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                    |                                                                                          |                                         | Albumi-<br>nes                          | Globulines |            |         |          |                                                                  |                                                      |
|                    |                                                                                          |                                         |                                         | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                                  |                                                      |
| 85                 | Etat grave. Protidémie<br>50 g. p. 1000 ml.                                              | 40,0                                    | 25,0                                    | 2,5        | 45,0       | 17,5    | 10,0     | II0                                                              | 94                                                   |
| 85 bis             | Le même trois mois<br>après. Meilleur état<br>général. Protéinurie<br>4,0 g. p. 1000 ml. | 56,0                                    | 33,0                                    | 5,0        | 43,0       | 6,5     | 12,5     | II4                                                              | 126,5                                                |
| 85 ter             | Le même, point maximum<br>de la crise. Protéinu-<br>rie 45 g. p. 1000 ml.                | 50,5                                    | 30,0                                    | 3,5        | 41,0       | 13,5    | 12,0     | II2                                                              | 96                                                   |
| 85 qto             | Le même, état général<br>satisfaisant.                                                   | 61,5                                    | 30,0                                    | 3,0        | 42,0       | 13,0    | 12,0     | II2                                                              | 131                                                  |
| 86                 | Début d'une rechute.<br>Protéinurie : traces.                                            | 56,0                                    | 33,0                                    | 5,0        | 43,0       | 6,5     | 12,5     | II4                                                              | 126                                                  |
| 86 bis             | Le même. Etat sensible-<br>ment stationnaire.                                            | 47,5                                    | 28,0                                    | 3,5        | 44,0       | 14,0    | 10,5     | II2                                                              | 111                                                  |
| 86 ter             | Le même. Aggravation<br>nette. Protéinurie<br>15 g. p. 1000 ml.                          | 50,5                                    | 30,0                                    | 3,5        | 41,0       | 13,5    | 12,0     | II2                                                              | 96,5                                                 |
| 86 qto             | Le même un mois après.<br>Etat général satisfai-<br>sant.                                | 49,0                                    | 29,5                                    | 3,5        | 47,0       | 14,5    | 5,5      | II2                                                              | 131                                                  |

TABLEAU XXII

Variation des groupes aminés basiques des protéines sériques  
dans la néphrose lipidique

| Echantillons<br>N° | Evolution de<br>l'affection                                       | Protidémie en<br>g. p.<br>1000 ml. | Pourcentage des fractions<br>protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>SA/SG<br>obtenu à<br>l'électrophorèse | Nbt<br>trouvé<br>à partir<br>de P/N<br>du précipité |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------|---------|----------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                    |                                                                   |                                    | Albumi-<br>nes                          | Globulines |            |         |          |                                                                    |                                                     |
|                    |                                                                   |                                    |                                         | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                                    |                                                     |
| 87                 | Etat grave protéinurie<br>18 g. p. 1000 ml.                       | 40,0                               | 25,0                                    | 2,5        | 45,0       | 17,5    | 10,0     | II0                                                                | 94                                                  |
| 88                 | Etat grave protéinurie<br>23 g. p. 1000 ml.                       | 46,0                               | 31,0                                    | 9,0        | 26,0       | 24,0    | 10,0     | II3                                                                | 90                                                  |
| 89                 | Etat assez grave<br>protéinurie<br>21 g. p. 1000 ml.              | 33,0                               | 24,0                                    | 4,0        | 40,0       | 25,0    | 6,0      | II0                                                                | 103                                                 |
| 89 bis             | Le même, amélioration<br>nette, protéinurie<br>8,4 g. p. 1000 ml. | 46,0                               | 21,0                                    | 4,0        | 42,0       | 28,0    | 5,0      | II9                                                                | 127                                                 |
| 89 ter             | Le même, rechute<br>éventuelle. Protéinurie<br>10 g. p. 1000 ml.  | 42,0                               | 29,0                                    | 4,0        | 38,0       | 23,0    | 6,0      | II2                                                                | 114                                                 |
| 89 qto             | Le même, guérison<br>momentanée.                                  | 50,0                               | 30,0                                    | 3,0        | 37,0       | 24,0    | 6,0      | II2                                                                | 129                                                 |

Par contre, les valeurs de Nbc restent pratiquement identiques dans tous les cas. Ce fait est en accord avec l'électrophorèse. De nombreux auteurs et parmi ceux-ci ROGET et GROULADE [109] d'une part et RAYNAUD et d'ESHONGUES [104] d'autre part, ont montré les variations électrophorétiques des protéines sériques dans la néphrose lipoïdique : à une protidémie basse et s'abaissant d'autant plus que l'état devient plus grave, on note un abaissement important de la sérum-albumine et en corollaire une augmentation importante de la fraction  $\alpha_2$  globuline.

Le protéinogramme n'est que peu modifié au cours de la maladie. Ceci explique la stabilité du Nbc. Mais, même lorsque l'enfant est guéri, ou tout au moins quand il rentre dans une période de rémission, l'électrophorégramme est peu modifié (ENSELME [43], MOUY [89]).

### b) NÉPHRITE

Nous avons pu étudier les variations de la teneur en groupes cationiques (basiques) des protéines de trois sérums de sujets atteints de néphrite. Les trois résultats obtenus sont peu significatifs. Nous

TABLEAU XXIII

Valeurs comparées du Nbt et Nbc dans des sérums de néphrite

| Echan-<br>tillons<br>N° | Evolution de<br>l'effection | Protidé-<br>mie en<br>g. p.<br>1000 ml. | Pourcentage des fractions<br>protéiques |            |            |         |          | Nbc<br>calculé<br>d'après<br>SA/SG ob-<br>tenu à<br>l'électro-<br>phorèse | Nbt<br>trouvé<br>d'après<br>P/N du préci-<br>pité |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------|---------|----------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                         |                             |                                         | Albumi-<br>nes                          | Globulines |            |         |          |                                                                           |                                                   |
|                         |                             |                                         |                                         | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |                                                                           |                                                   |
| 90                      | Période d'état.             | 74,0                                    | 43,0                                    | 4,0        | 19,0       | 20,0    | 15,0     | 118                                                                       | 114                                               |
| 91                      | " "                         | 60,0                                    | 45,0                                    | 3,0        | 19,0       | 27,0    | 6,0      | 119                                                                       | 106                                               |
| 92                      | " "                         | 83,0                                    | 57,0                                    | 6,0        | 13,0       | 11,0    | 13,0     | 124                                                                       | 110                                               |

les avons rassemblés dans le *tableau XXIII*. Les valeurs de Nbt sont abaissées et comprises entre 106 et 114. L'écart entre ces valeurs et celles calculées pour Nbc est modéré. Il n'en demeure pas moins un certain abaissement du Nbt.

### III. — CONCLUSIONS

Nous avons déterminé la teneur en groupes cationiques des protéines totales dans 84 sérums de sujets atteints d'affections diverses.

Dans 47 cas, nous avons pu observer des variations du Nbt supérieures à 10 p. 100 en deçà ou au delà de la valeur moyenne Nbt = 125.

Dans 40 cas, nous avons pu noter l'écart modéré différence de 10 p. 100 au moins) entre les valeurs du Nbc et Nbt.

Quinze sérums ont présenté un écart particulièrement significatif du Nbt, supérieur à 142, qui devrait être la valeur moyenne normale si toutes les protéines sériques étaient de la sérum-albumine.

Pour 14 sérums, Nbt a été inférieur à 100, valeur limite si toutes les protéines étaient des globulines.

Ces variations importantes s'observent dans toutes les affections que nous avons pu étudier.

Il semble même que le dosage des groupes cationiques des protéines sériques permet de suivre l'évolution d'une maladie.

Plusieurs déterminations effectuées chez un enfant atteint de néphrose lipoïdique montrent que la diminution du Nbt coïncide avec les crises aiguës ; tandis qu'une valeur normale, ou même supérieure à la normale, est allée de pair avec une amélioration de l'état général. Il en est de même dans les cirrhoses alcooliques et dans les affections tumorales.

Par contre, dans les maladies infectieuses (virales, bactériennes ou parasitaires), les variations des Nbt s'effectuent suivant un processus inverse : augmentation des valeurs des Nbt au moment des crises, puis retour vers la normale, et même à des valeurs légèrement inférieures à la normale à la guérison.

Il est curieux en effet de constater que Nbt varie souvent en sens inverse dans la maladie, puis à la convalescence, comme si une réaction de l'organisme libérait des groupes cationiques quand ceux-ci sont diminués au cours d'une affection et inversement. C'est ainsi que Nbt fortement augmenté pendant la crise de rhumatisme articulaire aiguë, est plus faible que Nbc pendant la convalescence. Le phénomène inverse s'observe dans des cas d'épithéliomas traités par radio ou curiethérapie.

Cet ensemble de déterminations, quoique restreint, permet de confirmer l'apparition de protéines anormales dans l'organisme lors de différentes affections. La détermination des groupes cationiques des protéines sériques peut fournir également des indications précieuses dans l'établissement d'un diagnostic. En outre, elle peut être utilisée pour suivre l'évolution d'une affection.

## DEUXIEME PARTIE

---



## CHAPITRE 1

---

### **A) Détermination par l'acide phytique des groupes cationiques des différentes fractions protéiques du sérum**

Au cours des chapitres précédents, nous avons étudié les variations de la teneur en groupes cationiques (Nbt) des protéines dans le sérum de sujets présumés normaux, dans des sérums pathologiques, ainsi que sur des fractions isolées.

Dans le cas des protéines isolées : sérum-albumine,  $\gamma$  globulines ou fibrinogène, nous avons obtenu des résultats identiques à ceux obtenus par titration potentiométrique relevés dans la littérature (HAUROWITZ [66], TRISTRAM [128]).

Dans le cas des sérums de sujets présumés normaux, les valeurs trouvées pour Nbt ont toujours été constantes ; Nbt voisin de 125 pour les adultes, légèrement inférieur pour les enfants (110 à 120), légèrement supérieur pour les vieillards (125 à 130).

Mais avec les sérums pathologiques, nous avons pu observer des variations fréquentes (47 cas sur 84 étudiés) et importantes, dépassant largement (142 (valeur extrême si toutes les fractions avaient été des albumines) ou au contraire descendant nettement en dessous de 100 (valeur limite si toutes les fractions avaient été des globulines).

De telles variations nous ont donc conduit à rechercher sur quelle fraction protéique portait la modification éventuelle de la teneur en groupes cationiques.

A cet effet, il nous fallait fractionner les protéines sériques. Nous avons recherché parmi différentes méthodes celle qui paraît nous fournir les meilleurs résultats, et les plus constants.

## I. — CHOIX DE LA MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT

### 1) FRACTIONNEMENT PAR LES SELS

Nous avons essayé plusieurs techniques concurremment : fractionnement par le tampon phosphate de Cohn de pH 6,72 [30], par le sulfite de sodium suivant le protocole de R. ARDRY [3], et par le sulfate d'ammonium d'après KAYSER [77].

Nous avons pu vérifier qu'il n'y avait aucune concordance possible des résultats entre eux : la fraction précipitée n'étant pas toujours la même.

D'autre part, la force ionique rendait nécessaire une dialyse, qui s'accompagnait d'une précipitation des globulines.

### 2) ESSAIS D'UTILISATION DE L'ELECTROPHORESE EN GELOSE

Nous avons tenté d'appliquer la séduisante méthode de GRABAR (\*), l'électrophorèse sur plaque de gélose [60 - 62 - 130]. Mais il est nécessaire de chauffer le sérum vers + 40° afin de l'incorporer à la gélose, ce qui a entraîné une diminution des Nb du même ordre de grandeur que celle indiquée par LOISELEUR [83]. Les tentatives effectuées en disposant le sérum sur la couche de gélose refroidie, n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

### 3) ESSAIS DE FRACTIONNEMENT SUR RESINE ECHANGEUSE D'IONS

Nous avons utilisé en chambre froide la colonne de résine Dovex 50, selon le protocole de BOWMAN [22], la quantité de protéines séparées a été trop faible. En effet, nous ne pouvions opérer que sur 0,15 à 0,20 ml de sérum.

---

(\*) Nous désirons remercier le Professeur GRABAR et ses collaborateurs pour avoir bien voulu nous autoriser à réaliser ces essais dans leur laboratoire de l'Institut Pasteur et nous communiquer obligeamment tous renseignements utiles pour l'emploi de leur technique.

#### 4) METHODE DE FRACTIONNEMENT UTILISEE

Nous avons utilisé l'électrophorèse sur papier en employant une technique sensiblement identique à celle de GRASSMANN [63].

En ayant recours simultanément à deux appareils à électrophorèse, ce qui donne la possibilité d'employer quatre grandes bandes de papier, nous avons pu fractionner environ 0,75 ml de sérum.

Avant de commencer l'étude systématique des sérums humains supposés normaux et des sérums pathologiques, nous avons pratiqué quelques essais préliminaires dans le but de rechercher l'influence du courant électrique sur les protéines d'une part et d'autre part de mettre au point les protocoles de séparation, d'élution et de précipitation suivants.

## II. — TECHNIQUES UTILISEES

### 1) FRACTIONNEMENT ELECTROPHORETIQUE

#### — Appareillage électrique :

Un appareil à électrophorèse sur papier, Biolyon, comprenant un générateur de courant continu donnant de 110 volts à 350 volts suivant la résistance envisagée alimente deux groupes de cuves pouvant chacune supporter quatre bandes de papier à électrophorèse ordinaire.

#### — Intensité et passage du courant :

Nous avons fait passer 0,5 milliampère par cm de largeur de bande pendant 14 heures.

#### — Le tampon :

Un tampon barbital sodique de pH 8,65, formule :

- |                         |   |                           |
|-------------------------|---|---------------------------|
| — Solution A            | { | Véronal sodique : 41,20 g |
|                         |   | Eau distillée : 2.000 ml  |
| — Solution B (CIH N/10) |   |                           |

Mélanger 1.742 ml de solution A à 258 ml de solution B.

— *Le papier :*

Nous substituons aux quatre bandes utilisées couramment une seule grande feuille de 18 cm de large sur 54 cm de long. Papier Arches 302. En utilisant en même temps deux appareils, nous avons pu opérer avec quatre de ces grandes feuilles de papier. Sur chacune d'elles, l'on peut étaler facilement de 0,18 ml à 0,20 ml de sérum sans risque d'avoir de mauvaises séparations, le papier n'étant pas trop chargé.

— *Étalement :*

Nous mesurons dans une capsule 0,80 ml de sérum et avec un pinceau très mince nous pratiquons l'étalement. Nous sommes ainsi assurés de ne pas trop charger (\*) et d'avoir un étalement homogène (il reste toujours une faible quantité absorbée sur le pinceau).

— *Repérage des fractions :*

Après 14 heures, nous arrêtons l'électrophorèse et nous découpons parallèlement au côté le plus long une bande de 3 cm de large sur chacune des quatre feuilles de papier. Nous plongeons ces bandes découpées dans le révélateur de formule :

|                                                                        |        |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| — Bleu de bromophénol .....                                            | 1 g    |
| — Bleu de bromothymol .....                                            | 0,10 g |
| — Solution saturée de chlorure mercurique<br>dans l'alcool à 95° ..... | 100 ml |

Après une minute, nous lavons rapidement à l'eau courante et dès que nous pouvons repérer la position des fractions nous plaçons chaque bandelette respectivement devant les feuilles qui leur correspondent.

Nous marquons avec une règle et un crayon quelques points de repère sur les feuilles ; nous délimitons ainsi, grâce à ces témoins, la position de chaque fraction.

Il suffit ensuite de découper avec des ciseaux en bandes en suivant ces repères. On isole ainsi sur chaque bande une fraction protéique déterminée.

---

(\*) Il est préférable de ne pas trop charger une bande au départ, les séparations ne sont pas nettes. Il arrive même que l'on ait des enchevêtrements, chaque fraction ne migrant plus d'une façon rectiligne, mais sinueuse.

## 2) ELUTION

Nous utilisons le dispositif décrit par GANZIN et MACHEBŒUF [58].

Dans une enceinte pour chromatographie, de façon à opérer en atmosphère saturée, nous plaçons 10 tubes jaugés à 10 ml, chacun surmonté d'un entonnoir. Nous aurons ainsi 2 tubes pour chaque fraction protéique séparée (sérum-albumine,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  globulines), 2 bandes de papier s'égouttant sur le même tube.

Dans la cuvette contenant une solution de ClNa à 9 g p. 1.000, nous mettons à humecter 20 petites bandelettes de 2 cm de large sur 10 cm de long avant de commencer le repérage des fractions. Ces bandelettes serviront de support pour les bandes découpées après électrophorèse. Les bandelettes étant suffisamment humectées, on presse légèrement dessus sur une longueur de 1 cm environ les bandes de fractionnement.

L'humidité est suffisante pour coller ensemble bandes et bandelettes de papier.

La solution de ClNa s'écoulera alors le long des bandes en entraînant la presque totalité des protéines qui s'y trouvent.

En laissant l'élution s'effectuer pendant 8 heures, on est sûr d'obtenir une élution maximum. Le volume du liquide obtenu dans chaque tube est alors d'environ 5 ml.

## 3) PRECIPITATION PHYTIQUE

On réunira dans un seul tube les éluats de la sérum-albumine, dans un autre tube les éluats de l' $\alpha_1$  globuline et ainsi de suite pour les trois autres fractions globuliniques. On aura finalement chaque fraction protéique séparée en solution dans 10 ml de soluté à 9 g p. 1.000 de ClNa.

On effectuera alors la précipitation phytique sur 2 ml de chaque solution, en pratiquant deux précipitations pour le dosage des protéines et deux précipitations pour le dosage du phosphore fixé sur chaque fraction ; il est ainsi possible de réaliser deux fois le même dosage. Les quantités de phytate de sodium que nous avons employées se sont révélées chaque fois suffisantes pour la précipitation totale des protéines et la fixation maximum du phosphore. Nous avons évité ainsi des quantités trop importantes, qui provoquent souvent une adsorption du phosphore sur le précipité, et de là une erreur par excès.

De façon à standardiser la technique, nous amenons comme pour le sérum total à un volume final de 20 ml avec de l'eau bidistillée.

Les solutions M de I.H.P. Na (\*) sont calculées en molarité, compte tenu de la teneur en eau.

Dans une série de 20 tubes à centrifuger, nous mettons en présence les volumes suivants (tableau XXIV).

TABLEAU XXIV

| Fractions protéiques  | Sérum-albumine | Globulines |            |         |          |
|-----------------------|----------------|------------|------------|---------|----------|
|                       |                | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| (I)                   |                |            |            |         |          |
| Eluat                 | 2              | 2          | 2          | 2       | 2        |
| Solution IHP Na M/200 | I              |            |            |         |          |
| Solution IHP Na M/600 |                | I          | 2          | 2,5     | 4        |
| Eau bidistillée       | 15,30          | 15,6       | 14,4       | 13,8    | 11,65    |
| CiH N/10              | 1,70           | 1,40       | 1,60       | 1,70    | 2,35     |

(1) Les chiffres indiquent les ml de solution.

Nous avons 4 tubes à centrifuger pour chaque fraction. Deux serviront au dosage de l'azote protéique et 2 autres à la détermination du phosphore précipité.

Les quantités respectives de CiH N/10 ajoutées nous ont toujours permis d'être au voisinage de pH  $2,30 \pm 0,05$  pour toutes les fractions, sauf pour l' $\alpha_1$  globuline où nous avons cherché à nous

(\*) La solution de phytate de sodium M/200 contient 0,833 g p. 100 de phytinate de soude renfermant 41,35 p. 100 d'eau d'hydratation.

placer à  $\text{pH } 2,18 \pm 0,02$  (nous dirons plus loin les raisons de ces deux zones différentes de pH).

Nous centrifugeons à 6.500 tours-minute pendant cinq minutes, après une heure de précipitation à  $+ 2^\circ$ .

Nous recueillons les liqueurs surnageantes pour vérifier le pH. Nous égouttons les tubes à centrifuger sur un papier filtre. Sur les précipités, nous pratiquons le dosage de l'azote et du phosphore.

### 1) DOSAGE DE L'AZOTE PROTÉIQUE (\*)

Nous avons utilisé la technique du micro-Kjeldahl. Le précipité est mis en solution dans 2 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  pur R.P. Nous transvasons en rinçant avec de l'eau bidistillée dans des micro-ballons de minéralisation munis de rodages. En présence de catalyseur de Boivin (sulfate mercurique, oxyde jaune de mercure, sulfate cuivrique à parties égales), une heure et demie suffit pour la minéralisation.

L'ammoniaque formé est titré directement dans le distillat par  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/50 en présence de l'indicateur de FLEURY [53]. Le chiffre d'azote obtenu est multiplié par le coefficient de 6,25 pour obtenir le taux de protéines.

### 2) DOSAGE DU PHOSPHORE FIXÉ

Le précipité est mis en solution dans 2 ml de  $\text{NO}_3\text{H}$  concentré R.P. en présence de réactif nitro-zincique (\*\*) (0,50 ml pour toutes les fractions sauf 0,25 ml pour l' $\alpha_1$  globuline).

Nous calcinons ensuite jusqu'à cendres blanches dans les tubes à centrifuger en pyrex. On peut reprendre par  $\text{NO}_3\text{H}$  jusqu'à cendres blanches. En général cependant, la reprise par  $\text{NO}_3\text{H}$  est inutile (THIVOLLE [126]).

On dissout le minéralisat dans une solution d'acide nitrique à 10 p. 100 ; on porte dix minutes au bain-marie bouillant de façon à hydrolyser les acides polyphosphoriques qui auraient pu se former.

Une fois refroidi, on complète à 5 ml dans un tube jaugé et on dose le phosphore par la méthode colorimétrique de Misson, selon le protocole opératoire de FLEURY et LECLERC [57] : à 5 ml de solu-

---

(\*) Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de barbital dans l'ensemble des précipités, ceux-ci ont été extraits par l'éther acide, après évaporation, le résidu n'a jamais fourni de réaction cobaltique de Parri positive.

(\*\*) Le réactif nitro-zincique est obtenu en dissolvant 7 g de poudre de zinc dans 50 ml de  $\text{NO}_3\text{H}$  concentré R.P.

tion, on ajoute 5 ml de réactif de Misson. La lecture est réalisée au spectrophotomètre Jobin et Yvon à 4.300 Å° (pour la sérum-albumine il est souvent nécessaire d'effectuer la lecture avec une dilution au demi).

Sachant que pour chaque groupe basique l'on a 31 g de phosphore associé à 10° g de protéine, nous calculons le Nb comme pour les protéines totales du sérum.

### III. — INFLUENCES DE DIFFÉRENTS FACTEURS (DÉTAILS PRATIQUES COMPLÉMENTAIRES)

Les essais préliminaires que nous avons effectués sur la sérum-albumine, les  $\gamma$  globulines et différents sérums supposés normaux ont toujours donné des résultats réguliers. Mais lorsque nous sommes passés à l'étude de sérums pathologiques (rhumatisme articulaire aigu, néphrose lipoïdique...), nous avons eu des résultats inconstants. Jusqu'alors nous opérons à la température du laboratoire.

#### 1) INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Nous avons effectué d'autres essais en chambre froide à + 2°. Nous avons alors obtenu des résultats réguliers avec les mêmes sérums pathologiques. Depuis lors, tous nos essais s'effectuent à + 2°, aussi bien pour les sérums supposés normaux, qui nous permettent d'encadrer les sérums pathologiques, que pour ceux-ci.

En recevant le sérum du sujet, nous le centrifugeons et aussitôt après nous le transportons dans une boîte maintenue à + 4° (par addition de quelques cubes de glace) jusqu'en chambre froide à + 2°, où tous les différents temps de fractionnement y sont pratiqués : électrophorèse, repérage des zones, découpage, élution, et précipitation phytique. Puis nous centrifugeons ; c'est seulement après la centrifugation que nous effectuons les déterminations ultérieures à la température du laboratoire.

#### 2) INFLUENCE DE L'HUMIDITÉ DU PAPIER

Il est très important d'opérer le plus rapidement possible, le repérage et le découpage des bandes ; il faut éviter que le papier ne se

dessèche, ce qui provoque une modification du Nb, comme nous avons pu le constater. D'autre part, pour découper les bandes, ne tenir le papier qu'en dehors de la zone de migration des protéines.

### 3) INFLUENCE D'UNE TROP GRANDE QUANTITE DE CINa

Nous utilisons les proportions de CINa à 9 pour 1.000 que nous avons précédemment indiquées (2 ml), car une force ionique trop forte inhibe d'une façon plus ou moins importante la précipitation phytique des protéines à ces pH.

### 4) IMPORTANCE PARTICULIERE DU pH SUR LA PRECIPITATION DE TRES FAIBLES QUANTITES DE PROTEINES

Dans le sérum total, la précipitation totale des protéines s'effectuait de pH 1,90 à 2,50 ; et à cette zone de pH le pourcentage de phosphore fixé atteignait son maximum.

Avec de faibles quantités de protéines en solution dans 2 ml de sérum physiologique, il n'en est pas de même. Des résultats non comparables nous poussèrent à étudier l'influence du pH sur la précipitation et la fixation du phosphore avec de faibles quantités de protéines.

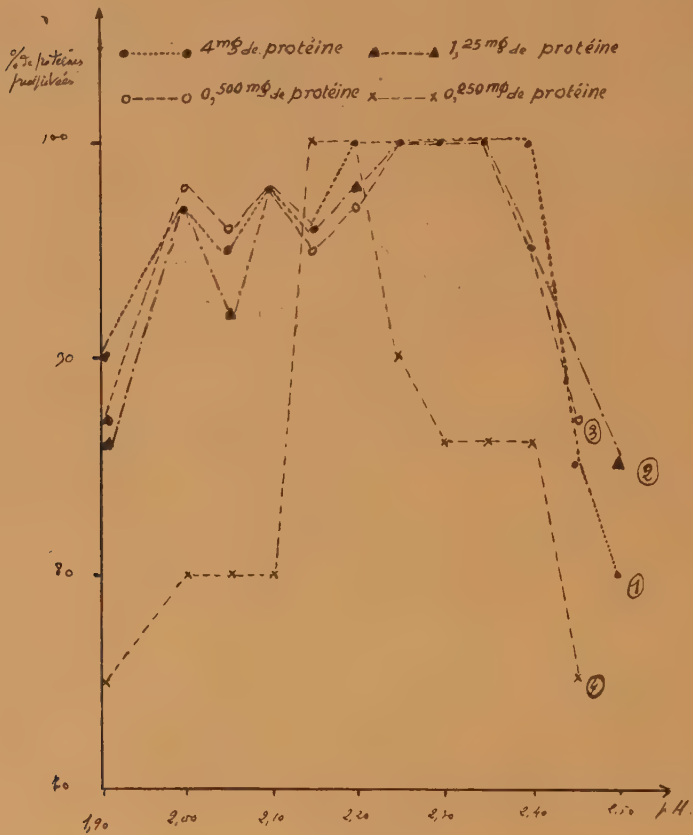
Nous avons étudié quatre concentrations différentes de protéines en solution dans 2 ml de CINa à 9 p. 1.000 : 0,2, 0,5, 1,25 et 4 mg. De cette façon, nous nous trouvions dans le voisinage des quantités habituellement présentes dans les fractionnements de sérums supposés normaux.

#### a) INFLUENCE DU pH SUR LA PRÉCIPITATION DE 4 MG DE PROTÉINES

A partir d'un mélange de sérums supposés normaux, dont nous avons déterminé le taux de protéines et dont nous connaissions le Nbt, nous avons effectué une dilution pour obtenir 4 mg de protéines dans 2 ml de solution renfermant 9 p. 1.000 de chlorure de sodium.

Nous avons pratiqué une précipitation phytique suivant le protocole précédemment décrit, et en faisant varier le pH par addition de ClH N/10. La courbe de précipitation des protéines est la courbe n° 1 du *graphique III*.

Nous pouvons constater une précipitation totale des protéines entre pH 2,20 et 2,40. De pH 2 à 2,20, on ne précipite en moyenne que 95 p. 100 des protéines en solution.



GRAPHIQUE III

Influence du pH sur la précipitation par l'acide phytique de faibles quantités de protéines en solution dans 2 ml de soluté de ClNa à 9 g p. 1.000

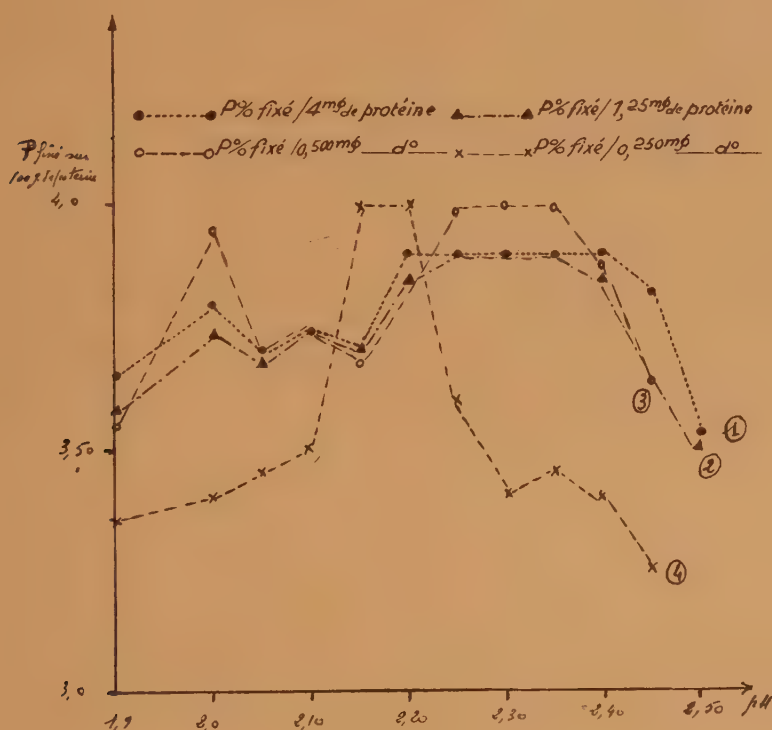
Le pourcentage de fixation du phosphore (courbe n° 1, graphique IV) est maximum entre les mêmes pH 2,20 à 2,40. Dans cette zone, nous retrouvons le même Nb que sur le sérum total.

Nous pouvons donc en déduire que pour 4 mg environ de protéines on aura intérêt à se placer à pH  $2,3 \pm 0,05$ . C'est à ce pH que nous précipitons la sérum-albumine éluee après électrophorèse.

b) INFLUENCE DU pH SUR LA PRÉCIPITATION ET LE POURCENTAGE DU PHOSPHORE FIXÉ SUR DES QUANTITÉS DE PROTÉINES DE 0,5 A 1,25 MG

La précipitation est indiquée par les courbes 2 et 3 du graphique III; elles ont une allure identique.

Comme pour une quantité plus importante de protéine, la zone de pH où la précipitation est totale et où la fixation du phosphore est maximum est la même mais plus réduite puisqu'elle est comprise entre les deux limites très étroites de pH 2,25 à 2,35.



GRAPHIQUE IV

Influence du pH sur la précipitation du P

Pour de telles quantités, il devient donc particulièrement important de fixer rigoureusement le pH.

De pH 2,0 à 2,25, 95 à 98 p. 100 seulement des protéines sont précipitées. Nous pouvons noter qu'ici encore à pH  $2,30 \pm 0,05$ , nous avons retrouvé le maximum de phosphore fixé (courbes 2 et 3 du graphique IV).

Dans le cas de la courbe n° 2, nous avons le même mélange de sérum que pour la première courbe. Le Nbt était de 126.

Pour la courbe n° 3 et celle que nous indiquons plus loin, nous avons employé un autre mélange de sérums supposés normaux, dont le Nbt était de 129.

Après dilution et précipitation phytique à pH  $2,30 \pm 0,05$ , nous avons retrouvé 129.

c) INFLUENCE DU PH DANS LE CAS D'UNE TRÈS FAIBLE QUANTITÉ DE PROTÉINES : 0,200 MG DANS 2 ML

Les pourcentages de précipitation sont représentés par la courbe 4 du graphique III.

Nous pouvons observer qu'ici la zone de pH est devenue très étroite et fortement décalée. Il faut se trouver à pH  $2,18 \pm 0,02$ . En deçà et au delà, on ne précipite que 80 à 86 p. 100 des protéines. Le pourcentage de phosphore fixé varie dans le même sens (courbe 4 du graphique IV).

La difficulté ne vient pas tellement de l'exiguïté de la zone de précipitation puisque nous avons retrouvé le même Nbt que le sérum total, et que d'autre part, comme nous le verrons plus loin, les résultats obtenus pour l' $\alpha_1$  globuline et des sérums supposés normaux sont constants.

Mais la difficulté apparaît au fur et à mesure que la concentration en protéine croît, car le pH de précipitation totale des protéines et de fixation maximum du phosphore se déplace vers pH 2,30.

En comparant la précipitation des protéines de pH 2,00 à pH 2,50 pour 0,200 mg et 0,500 mg de protéines (courbes 3 et 4 du graphique III), on voit qu'il existe entre les deux zones de précipitation maximum un léger écart. Ecart qui diminue au fur et à mesure que la concentration protéique croît ; d'autre part, le pH maximum de précipitation tend à se déplacer vers pH 2,30. L'écart est beaucoup plus apparent pour le phosphore fixé (courbes 3 et 4 du graphique IV).

#### IV. — CONCLUSIONS DÉDUITES DE L'ÉTUDE DU PROTOCOLE OPÉRATOIRE

D'après les essais, il apparaît indispensable :

1° D'effectuer les fractionnements et les éluions en chambre froide à  $+ 2^{\circ}$ .

2° De fixer très exactement la zone de pH où l'on pratique la précipitation phytique, à savoir :

— pH  $2,30 \pm 0,05$  pour toutes les fractions protéiques, sauf l' $\alpha_1$  globuline ;

— et pH  $2,18 \pm 0,02$  dans le cas de l' $\alpha_1$  globuline.

Il est ainsi aisé d'obtenir le pH de 2,30 habituellement requis. pH 2,18 peut s'obtenir assez facilement, mais dans tous les cas pathologiques où l'on observe une élévation du taux de l' $\alpha_1$  globuline, étant donné qu'avant d'effectuer le fractionnement on dose les protides totaux et que l'on calcule le Nbt du sérum total et le Nbc à partir de l'électrophorèse, il est facile de prévoir la quantité d' $\alpha_1$  globuline, que l'on obtiendra et de ce fait se placer au pH convenable de précipitation.

3° Dans le cas de sérums pathologiques comme la néphrose lipoïdique et les myélomes, où une fraction protéique particulière est très augmentée ( $\alpha_2$  globuline pour la néphrose, ou  $\beta$  ou  $\gamma$  globuline dans le myélome), on emploie un protocole de précipitation pour la fraction anormalement augmentée, dans lequel la quantité de phytate de sodium est plus importante : on opère alors comme pour la sérum-albumine.

#### V. — RÉCAPITULATION DU PROTOCOLE DES ESSAIS PRATIQUES SUR DES SÉRUMS SUPPOSÉS NORMAUX

Quel que soit le sérum à étudier, nous avons toujours employé le même mode opératoire :

1° Une précipitation phytique sur le sérum total. Nous obtenons ainsi les protéines totales et le phosphore fixé rapporté à 10° g de protéines. Nous calculons le Nbt.

2° Une électrophorèse normale sur le sérum total. Nous obtenons ainsi le Nbc.

3° Une séparation électrophorétique sur grande bande, suivie d'une élution de chaque fraction.

4° D'après le pourcentage des différentes fractions obtenues à l'électrophorèse normale sur papier, nous comparons le Nbt à la somme des Nb de chaque fraction, compte tenu de leurs pourcentages respectifs, somme que nous appelons Nbc<sub>2</sub>.

Dans les essais que nous avons réalisés, nous avons toujours comparé les résultats du Nbt du sérum total avec le Nbc<sub>2</sub> de la somme des différentes fractions ; en outre, nous avons essayé de déterminer sur quelles fractions pouvaient porter les variations les plus importantes du Nb.

Nous utiliserons donc les symboles suivants pour examiner le taux de groupes basiques rapportés à une protéine de poids moléculaire 100.000 renfermant 16 p. 100 d'azote total.

1) Total du sérum déterminé par précipitation phytique : Nbt.

2) De chaque fraction protéique déterminée par précipitation phytique : Nb.

3) Calculé à partir de l'électrophorèse sur papier du sérum : Nbc<sub>1</sub>.

4) Calculé à partir des Nb de chacune des fractions protéiques, compte tenu de leur pourcentage respectif à l'électrophorèse : Nbc<sub>2</sub>.

Nous dénommerons ensuite :

— le pourcentage d'écart entre Nbt et Nbc<sub>1</sub> : A ;

— le pourcentage d'écart entre Nbt et Nbc<sub>2</sub> : B.

## B) Résultats obtenus

Avant de commencer l'étude systématique des sérums humains supposés normaux et des sérums pathologiques, nous avons pratiqué quelques essais préliminaires dans le but de rechercher si l'électrophorèse suivie d'une élution par une solution de ClNa à 9 g p. 1.000 pouvait modifier le Nb d'une protéine.

# 1) RECHERCHE DE L'ACTION DU COURANT ELECTRIQUE SUIVIE D'UNE ELUTION SUR LE Nb D'UNE PROTEINE

Nos essais ont porté sur deux protéines purifiées : sérum-albumine et  $\gamma$  globuline (\*).

Nous avons fait respectivement deux solutions dans du sérum physiologique : sérum-albumine à une concentration de 70 g p. 1.000 et  $\gamma$  globuline à 40 g p. 1.000. Sur ces deux solutions, nous avons pratiqué une précipitation phytique suivant la même technique que pour le sérum total.

Nous avons retrouvé respectivement un Nb de 143 pour la sérum-albumine et un Nb de 101 pour la  $\gamma$  globuline.

TABLEAU XXV  
Etude de l'action de l'électrophorèse  
suivie d'élution sur le Nb d'une protéine

|                    | Nb<br>avant<br>traitement | Nb<br>après électrophorèse suivie d'élution |       |     |     |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------------------|-------|-----|-----|
|                    |                           | N° 1                                        | 2     | 3   | 4   |
| Sérum-<br>albumine | 143                       | 140                                         | 142,5 | 141 | 141 |
| Globuline          | 101                       | 100                                         | 98    | 100 | 100 |

Ensuite, après électrophorèse de ces deux solutions suivie d'élution par du sérum physiologique pendant huit heures suivant le protocole précédemment décrit, nous avons de nouveau effectué une précipitation phytique. Les résultats rassemblés dans le *tableau XXV* montrent qu'il n'y a pas de modification du Nb. Nous avons retrouvé les mêmes valeurs ayant et après traitement. Nous pouvions alors commencer nos essais sur différents sérums supposés normaux, puisque le courant électrique d'une part et l'élution de huit heures sur papier d'autre part ne semblent pas apporter de modifications dans le Nb.

---

(\*) Ces deux protéines nous ont été obligeamment fournies par MM. R. ARDRY et J. STORCK, du Centre de Transfusion Sanguine de l'Armée.

TABLEAU XXVI — Nb pour 10<sup>5</sup> g de protéines des différents fractions du sérum de sujets supposés normaux

| Fractions protéiques  | N° 101<br>Femme<br>21 ans |     | N° 102<br>Femme<br>23 ans |     | N° 103<br>Homme<br>35 ans |      | N° 104<br>Garçon<br>12 ans |       | N° 105<br>Fille<br>9 ans |     | N° 106<br>Fille<br>10 ans |      | N° 107<br>Fille<br>15 ans |      | N° 108<br>Garçon<br>14 ans |     | N° 109<br>Homme<br>55 ans |     | N° 110<br>Femme<br>21 ans |      |
|-----------------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|------|----------------------------|-------|--------------------------|-----|---------------------------|------|---------------------------|------|----------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|------|
|                       | (1)<br>%                  | Nb  | %                         | Nb  | %                         | Nb   | %                          | Nb    | %                        | Nb  | %                         | Nb   | %                         | Nb   | %                          | Nb  | %                         | Nb  | %                         | Nb   |
| Sérum albumine        | 60                        | 142 | 61                        | 145 | 62                        | 143  | 58                         | 140   | 58                       | 140 | 60                        | 138  | 57                        | 145  | 61                         | 144 | 60                        | 147 | 60                        | 143  |
| $\alpha_1$ globulines | 3,5                       | 118 | 3,0                       | 120 | 3,0                       | 126  | 3,5                        | 123,5 | 3,5                      | 124 | 4,0                       | 121  | 3,5                       | 122  | 2,5                        | 121 | 3,0                       | 120 | 3,5                       | 124  |
| $\alpha_2$ globulines | 8,0                       | 80  | 8,0                       | 76  | 9,0                       | 85   | 8,5                        | 77,5  | 8,5                      | 82  | 9,0                       | 75   | 10,0                      | 75,5 | 8,5                        | 89  | 9,0                       | 81  | 9,0                       | 80   |
| $\beta$ globulines    | 10,5                      | 125 | 10,0                      | 127 | 11,0                      | 125  | 12,0                       | 127   | 12,0                     | 121 | 11,0                      | 121  | 12,0                      | 125  | 11,0                       | 123 | 12,0                      | 121 | 12,0                      | 118  |
| $\gamma$ globulines   | 18,0                      | 98  | 18,0                      | 101 | 15,0                      | 99,5 | 18,0                       | 87    | 18,0                     | 90  | 16,0                      | 87,5 | 17,5                      | 95   | 17,0                       | 92  | 16,0                      | 103 | 15,5                      | 99,5 |
| Nbt (2)               | 132                       |     | 129                       |     | 126                       |      | 126                        |       | 127                      |     | 127,5                     |      | 124,5                     |      | 123,5                      |     | 128                       |     | 129                       |      |
| Nbc1 (3)              | 125                       |     | 125,5                     |     | 126                       |      | 124                        |       | 124                      |     | 125                       |      | 124                       |      | 125,5                      |     | 125                       |     | 125                       |      |
| Nbc2 (4)              | 126                       |     | 129,4                     |     | 128,5                     |      | 123                        |       | 123                      |     | 122                       |      | 126,5                     |      | 127,75                     |     | 130                       |     | 127                       |      |
| A (5)                 | -5,6                      |     | -2,78                     |     | 0                         |      | -1,63                      |       | -2,42                    |     | -2,00                     |      | -0,40                     |      | +1,58                      |     | -2,40                     |     | -3,30                     |      |
| B (6)                 | -4,75                     |     | +0,31                     |     | +1,95                     |      | -2,44                      |       | -3,26                    |     | -4,50                     |      | +1,58                     |      | +3,33                      |     | +1,54                     |     | -1,57                     |      |

(1) Pourcentage de chaque fraction déterminé par électrophorèse sur papier.

(2) Nbt = Nb pour 10<sup>5</sup> g de protéines totales du sérum.

(3) Nbc<sub>1</sub> = calculé à partir du pourcentage donné par électrophorèse sur papier (Nb de la sérum-albumine 142, Nb des globulines 100).

(4) Nbc<sub>2</sub> = somme des différents Nb d'après les pourcentages respectifs des fractions protéiques correspondantes.

(5) A = pourcentage d'écart entre Nbt et Nbc<sub>1</sub> :  $A = \frac{Nbt - Nbc_1}{Nbc_1} \times 100$ .

(6) B = pourcentage d'écart entre Nbt et Nbc<sub>2</sub> :  $B = \frac{Nbt - Nbc_2}{Nbc_2} \times 100$ .

## 2) ETUDE DU SERUM DE SUJETS PRESUMES NORMAUX (\*)

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau XXVI*. Les résultats présentent une nette stabilité. Nous pouvons observer que la moyenne des résultats obtenus pour la sérum-albumine est de 143. Ce qui est le chiffre théorique habituellement admis. Les valeurs les plus éloignées étant de 138 et 147.

Pour les  $\gamma$  globulines, le chiffre moyen est de 96. En fait, on ne peut guère conserver un chiffre moyen pour les  $\gamma$  globulines, car elles varient souvent de 90 à 103 suivant les individus.

Pour les trois autres fractions globuliniques, nous avons retenu comme Nb la moyenne des résultats trouvés, à savoir :

- 122 pour les  $\alpha_1$  globulines ;
- 80 pour les  $\alpha_2$  globulines ;
- 123 pour les  $\beta$  globulines.

En fait, on peut estimer que le Nb varie de 120 à 123 pour  $\alpha_1$ , de 79 à 81 pour  $\alpha_2$ , et de 123 à 125 pour  $\beta$ .

## 3) DISCUSSION

Nous pouvons également observer que pour ces sérums les proportions respectives des fractions protéiques évaluées par électrophorèse, affectée chacune du Nb trouvé, fournissent une somme  $Nbc_2$  qui est toujours très voisine de  $Nbt$ .

L'écart maximum entre  $Nbt$  et  $Nbc_2$ , soit B, est de 4,75 p. 100 et l'écart minimum est de 0,30 p. 100.

D'autre part, comme nous l'avions déjà montré dans les essais sur le  $Nbt$  des sérums de sujets présumés normaux, la différence entre  $Nbt$  et  $Nbc$ , calculé à partir de l'électrophorèse, est très faible, du même ordre de grandeur.

En outre, nous pouvons comparer également les résultats fournis par le calcul, d'après la teneur en bases hexoniques des différentes fractions protéiques du plasma.

Le nombre de groupes cationiques fournis par la teneur en bases hexoniques pour  $10^3$  g de protéines est calculé d'après les pourcen-

---

(\*) Les sérums d'adultes étudiés sont ceux du personnel de la pharmacie et du laboratoire de l'Hôpital Bretonneau. Nous tenons à leur exprimer toute notre gratitude. Les sérums d'enfants sont ceux de sujets hospitalisés pour fractures dans le service de chirurgie du Professeur LAURENCE.

tages d'amino-acides proposés par EDSALL [41]. Les teneurs en acides aminés sont identiques à celles relevées dans la littérature, en particulier de MÜTING [93] et de BRAND [24].

Nous avons rassemblé dans le *tableau XXVII* les valeurs obtenues par l'acide phytique et celles calculées d'après la teneur en acides aminés.

TABLEAU XXVII  
Valeurs comparées de la teneur en groupes cationiques  
des différentes fractions protéiques du plasma

|                                               | S A   | Globulines   |             |              |          | Fibrinogène |
|-----------------------------------------------|-------|--------------|-------------|--------------|----------|-------------|
|                                               |       | $\alpha_1$   | $\alpha_2$  | $\beta$      | $\gamma$ |             |
| Précipitation par l'acide phytique            | I43   | I22          | 80,0        | I23,0        | I00      | I23         |
| Calculé d'après la teneur en bases hexoniques | I42,6 | (2)<br>I23,4 | (1)<br>90,4 | (3)<br>I24,9 | 99,2     | I24,9       |
| -----<br>d'après EDSALL (41)                  |       |              |             |              |          |             |

- (1) La fraction  $\alpha_2$  d'EDSALL correspond à la fraction  $IV_6$  de COHN et contient des  $\beta_1$  globulines.
- (2) La fraction  $\alpha_1$  correspond à la fraction  $IV_1$  de COHN, elle contient un peu d' $\alpha_2$  et  $\beta$  globulines.
- (3) La fraction  $\beta$  d'EDSALL représente surtout la fraction  $\beta_1$  (c'est la somme des fractions  $IV_7$ ,  $III_0$ ,  $III_1$ ,  $III_2$  de COHN. Il y a peu de  $\beta_2$ ).

Les écarts sont minimes. Les plus importants portent sur la fraction  $\alpha_2$  globuline. Mais il est nécessaire de remarquer que la fraction  $\alpha_2$  correspond à la fraction  $IV_6$  de COHN et contient des  $\beta_1$  globulines [41]. Notre méthode de fractionnement par électrophorèse ne correspond pas exactement à cette fraction. Nous pouvons remarquer cependant que d'après la teneur en acides aminés la fraction  $\beta$  de COHN donne un Nb = 102,3. Si l'on fait le rapport des Nb des fractions  $\beta$  et  $\alpha_2$  globulines obtenues suivant notre méthode, nous trouvons 101,5, ce qui est très voisin.

Il est donc possible de considérer ces résultats comme identiques.

## CHAPITRE II

### **Teneur en groupes cationiques (basiques) des diverses fractions protéiques du sérum dans quelques états pathologiques**

---

Après avoir fractionné les protéines du sérum de sujets présumés normaux et en avoir déterminé la teneur en groupements cationiques, nous avons étudié de la même façon des sérums de sujets atteints de différentes affections.

Nous avons choisi de préférence : la néphrose lipoïdique, le rhumatisme articulaire aigu et l'ictère à virus, c'est-à-dire une maladie choisie dans chacun des trois principaux groupes d'affections où nous avons observé des variations pathologiques de la valeur du Nbt : maladies rénales, affections rhumatismales et affections hépatiques.

Comme nous avons observé des variations du Nb total selon le degré d'évolution de la maladie, nous avons procédé à des déterminations sur des échantillons de sérums prélevés à des stades différents de l'affection.

#### I. — RÉSULTATS OBTENUS

##### 1) NEPHROSE LIPOIDIQUE

Nous avons examiné six sérums. Les trois premiers (n<sup>os</sup> 111, 112 et 113) proviennent du même sujet à différents stades de la maladie. Les trois autres sont des sérums de trois autres sujets à des stades d'évolution différents.

Dans le cas particulier de la néphrose lipoïdique, où le pourcentage de la globuline  $\alpha_2$  est très fortement augmenté, la précipitation de cette protéine s'effectue selon le protocole décrit pour la sérum-albumine, c'est-à-dire que l'on emploie du phytate de sodium M/200

TABLEAU XXVIII

Variations du Nb des différentes fractions protéiques du sérum dans la néphrose lipotidique

| Sujet                  | (1)                     |       | N° III<br>Garçon 10 ans |      | N° II2<br>Garçon 10 ans |     | N° II3<br>Garçon 10 ans |     | N° II4<br>Garçon 12 ans |     | N° II5<br>Fille 8 ans |     | N° II6<br>Fille 15 ans |     |
|------------------------|-------------------------|-------|-------------------------|------|-------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|-----------------------|-----|------------------------|-----|
|                        | N° III<br>Garçon 10 ans |       | N° II2<br>Garçon 10 ans |      | N° II3<br>Garçon 10 ans |     | N° II4<br>Garçon 10 ans |     | N° II4<br>Garçon 12 ans |     | N° II5<br>Fille 8 ans |     | N° II6<br>Fille 15 ans |     |
|                        | 18,0                    |       | 45,6                    |      | traces                  |     | 0,20                    |     | 4,0                     |     | 8,0                   |     |                        |     |
| Fractions              | (2)                     |       |                         |      |                         |     |                         |     |                         |     |                       |     |                        |     |
|                        | %                       | Nb    | %                       | Nb   | %                       | Nb  | %                       | Nb  | %                       | Nb  | %                     | Nb  | %                      | Nb  |
| Sérum-albumine         | 18                      | 101   | 18                      | 108  | 39                      | 140 | 30                      | 141 | 40                      | 126 | 30                    | 120 | 30                     | 120 |
| $\alpha_1$ I globuline | 2,5                     | 104   | 3,5                     | 97,5 | 3,0                     | 117 | 4,5                     | 125 | 2,0                     | 99  | 3,0                   | 100 | 3,0                    | 100 |
| $\alpha_2$ 2 globuline | 42,0                    | 102   | 41,0                    | 91   | 31,0                    | 78  | 33,5                    | 81  | 30,0                    | 87  | 40,0                  | 90  | 40,0                   | 90  |
| $\beta$ globuline      | 32,5                    | 117,5 | 31,0                    | 110  | 19,0                    | 119 | 12,0                    | 120 | 20,0                    | 102 | 20,0                  | 113 | 20,0                   | 113 |
| $\gamma$ globuline     | 5,0                     | 94,5  | 6,5                     | 100  | 8,0                     | 102 | 20,0                    | 103 | 8,0                     | 101 | 7,0                   | 95  | 7,0                    | 95  |
| Nbt                    | 103                     |       | 84                      |      | 118                     |     | 107                     |     | 103                     |     | 106                   |     |                        |     |
| NbcI                   | 107,5                   |       | 107,5                   |      | 116,5                   |     | 112,5                   |     | 117                     |     | 112,5                 |     |                        |     |
| Nbc2 (5)               | 106,5                   |       | 100,8                   |      | 113                     |     | 110                     |     | 107                     |     | 104                   |     |                        |     |
| A % (3)                | +4,20                   |       | + 21,4                  |      | + 1,28                  |     | + 4,90                  |     | + 12,0                  |     | + 5,80                |     |                        |     |
| B % (4)                | + 3,28                  |       | + 16,6                  |      | - 4,40                  |     | + 2,72                  |     | + 3,74                  |     | -1,92                 |     |                        |     |

(1) Les nos 111, 112, 113 portent sur le même sujet à différentes étapes de la maladie.

(2) Pourcentages obtenus par électrophorèse sur papier.

(3) A = représente le pourcentage d'écart entre Nbt et Nbc<sub>1</sub>, soit : 
$$\frac{Nbt - Nbc_1}{Nbc_1} \times 100.$$
(4) B = représente le pourcentage d'écart entre Nbt et Nbc<sub>2</sub>, soit : 
$$\frac{Nbt - Nbc_2}{Nbc_2} \times 100.$$
(5) Nbc<sub>2</sub> = calculé d'après les valeurs de Nbt trouvées pour chaque fraction.

au lieu de M/600. Pour les autres fractions, rien n'est changé quant à la technique de précipitation exposée dans le précédent chapitre.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau XXVIII*. Il apparaît tout d'abord qu'à l'exception du Nb des  $\gamma$  globulines, les autres fractions manifestent des variations du Nb dont l'amplitude est plus ou moins marquée et se trouve en liaison avec le taux des protéines urinaires.

• Les  $\gamma$  globulines, dont le pourcentage tend à diminuer au fur et à mesure que le degré de l'affection augmente, ont un Nb qui semble demeurer assez constant et identique à celui de  $\gamma$  globulines d'un sérum normal.

Les trois autres fractions : sérum-albumine,  $\alpha_1$  et  $\beta$  globulines varient dans le même sens. La diminution du Nb est d'autant plus importante que la protéinurie du sujet est plus élevée. Dans le cas n° 112, l'abaissement est le plus accentué.

En corollaire, le Nb de la globuline  $\alpha_2$  augmente sensiblement. L'augmentation du Nb cependant ne semble pas suivre l'accroissement du taux des protéines urinaires.

Enfin, avec une protéinurie faible (essais n°s 113 et 114), les proportions respectives des protéines sériques demeurent toujours anormales. Cependant les Nb de ces diverses fractions ont des valeurs peu différentes de celles observées chez les sujets normaux.

## 2) RHUMATISME ARTICULAIRE AIGU

Nos essais ont porté sur six sérums, dont une maladie de Bouillaud en cours de traitement.

L'essai n° 117 est celui d'un sérum d'un sujet adulte présentant un état rhumatismal chronique. Les autres essais portent sur des sérums d'enfants hospitalisés et étudiés soit à la période de crise (essais n°s 118 et 119), soit après traitement (essais n°s 120 et 121).

Les résultats sont rassemblés dans le *tableau XXIX*.

L'examen de ces résultats semble montrer que dès l'état chronique rhumatismal, chaque fraction amorce déjà les variations typiques qu'elle prendra au moment de la crise. Ceci s'observe aussi bien pour les proportions respectives des diverses fractions [45] que pour les valeurs de leur Nb.

Nous pouvons observer une légère augmentation des Nb de la globuline  $\alpha_2$  et des  $\gamma$  globulines. Dans ce dernier cas, l'augmentation est très sensible à la phase aiguë de la maladie (essais n°s 118 et 119).

TABLEAU XXIX

Variations du Nb des différentes fractions protéiques du sérum dans le rhumatisme articulaire aigu

| Sujet                | N° 117<br>Homme 50 ans        |      | N° 118<br>Garçon 15 ans |     | N° 119<br>Garçon 11 ans |       | N° 120<br>Garçon 12 ans                  |       | N° 121<br>Garçon 8 ans                    |      | N° 122<br>Garçon 13 ans                               |       |
|----------------------|-------------------------------|------|-------------------------|-----|-------------------------|-------|------------------------------------------|-------|-------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------|-------|
| Etat pathologique    | Etat rhumatismal<br>chronique |      | Crise aigüe             |     | Crise aigüe             |       | 8 jours après<br>une crise<br>traitement |       | 20 jours après<br>une crise<br>traitement |      | Maladie de<br>BOULLAUD<br>traitement<br>depuis 1 mois |       |
|                      | %                             | Nb   | %                       | Nb  | %                       | Nb    | %                                        | Nb    | %                                         | Nb   | %                                                     | Nb    |
| Fractions            |                               |      |                         |     |                         |       |                                          |       |                                           |      |                                                       |       |
| Sérum-albumine       | 52                            | 150  | 40                      | 162 | 49                      | 160   | 52                                       | 139   | 48                                        | 147  | 44                                                    | 115   |
| $\alpha$ 1 globuline | 3,0                           | 111  | 7,0                     | 90  | 5,0                     | 77,5  | 3,0                                      | 86,5  | 4,0                                       | 115  | 4,0                                                   | 78,5  |
| $\alpha$ 2 globuline | 11,0                          | 88,5 | 13,0                    | 91  | 11,0                    | 95    | 13,0                                     | 101   | 15,0                                      | 90   | 18,0                                                  | 113   |
| $\beta$ globuline    | 14,0                          | 128  | 15,0                    | 106 | 13,0                    | 108   | 14,0                                     | 97,5  | 13,0                                      | 108  | 14,0                                                  | 157   |
| $\gamma$ globuline   | 20,0                          | 109  | 25,0                    | 120 | 22,0                    | 121   | 18,0                                     | 94,5  | 20,0                                      | 97,5 | 20,0                                                  | 102   |
| Nbt                  | 136                           |      | 134                     |     | 147                     |       | 120                                      |       | 126                                       |      | 111                                                   |       |
| Nbc1                 |                               | 122  |                         | 117 |                         | 120,5 |                                          | 122   |                                           | 120  |                                                       | 118,5 |
| Nbc2                 |                               | 130  |                         | 129 |                         | 143,5 |                                          | 116,3 |                                           | 122  |                                                       | 116,5 |
| A                    | - 11,5                        |      | -14,5                   |     | - 22,0                  |       | + 1,64                                   |       | - 5,0                                     |      | + 6,35                                                |       |
| B                    | - 4,6                         |      | - 3,88                  |     | - 2,45                  |       | - 3,20                                   |       | - 3,28                                    |      | - 4,75                                                |       |

Légende: voir tableau XXVIII.

Le Nb de la sérum-albumine présente une valeur légèrement au-dessus de la moyenne chez le chronique et une forte augmentation au moment de la crise.

Il apparaît en outre une légère baisse du Nb de la  $\beta$  globuline.

Dans la maladie de Bouillaud (essai n° 112), des résultats inverses ont été observés : diminution très marquée du Nb de la sérum-albumine et de la globuline  $\alpha_1$ , et augmentation notable des Nb des  $\alpha_2$  et  $\beta$  globulines.

Le traitement était déjà commencé depuis un mois environ quand nous avons analysé le sérum.

Nous pouvons noter également qu'après une quinzaine de jours de traitement (par la cortisone) des sujets étudiés (essais n°s 120 et 121), il y avait déjà un retour vers la normale des valeurs du Nb.

### 3) ICTERES A VIRUS

Nous avons étudié 6 cas d'ictère à virus (*tableau XXX*). Deux, tout au début de l'affection, n'ayant subi encore aucun traitement (essais n°s 123 et 124). Les autres à des étapes plus ou moins espacées au cours du traitement (essais n°s 125, 126 et 127).

Dans les essais n°s 123 et 124 effectués au début de la maladie, nous pouvons observer :

- une légère diminution du Nb de la sérum-albumine et de la globuline  $\alpha_1$  ;
- une très forte diminution du Nb de la  $\beta$  globuline ;
- par contre, une augmentation très importante du Nb des  $\gamma$  globulines ;
- le Nb de la globuline  $\alpha_2$  ne semble pas modifié.

Nous pouvons observer qu'ici comme dans les sérums provenant de sujets atteints de rhumatisme articulaire aigu, l'augmentation du Nb des  $\gamma$  globulines est particulièrement importante.

D'autre part, on peut observer pour les deux essais n°s 123 et 124 (*tableau XXX*) une différence importante entre les valeurs de Nbt et Nbc<sub>2</sub> ; elle est voisine de 19 p. 100 dans le cas de l'essai n° 123 et proche de 14 p. 100 pour l'essai n° 124. Avec les autres sérums étudiés, l'écartement Nbt et Nbc<sub>2</sub> est beaucoup plus faible : il varie de 2 p. 100 à 3,65 p. 100 (écarts minimum et maximum observés).

Nous n'avons pas trouvé de raisons satisfaisantes pour expliquer l'écart observé pour les essais n°s 123 et 124.

Les différences entre les valeurs des Nb trouvés et calculés, de même que les différences des Nb avec la valeur normale de chaque

TABLEAU XXX

Variations du Nb des différentes fractions protéiques du sérum dans les ictères à virus

| Sujet                | N° I23<br>Femme 31 ans |        | N° I24<br>Homme 35 ans    |       | N° I25<br>Garçon 12 ans            |       | N° I26<br>Fille 13 ans         |       | N° I27<br>Garçon 12 ans        |      | N° I28<br>Homme 85 ans             |       |
|----------------------|------------------------|--------|---------------------------|-------|------------------------------------|-------|--------------------------------|-------|--------------------------------|------|------------------------------------|-------|
| Etat pathologique    | ictère pris au début   |        | ictère pris tout au début |       | ictère étudié dans la phase d'état |       | après 3 semaines de traitement |       | après 5 semaines de traitement |      | 8 jours après la fin du traitement |       |
| Fractions            | %                      | Nb     | %                         | Nb    | %                                  | Nb    | %                              | Nb    | %                              | Nb   | %                                  | Nb    |
| Sérum-albumine       | 42                     | 133    | 40                        | 136   | 43                                 | 128   | 51                             | 140   | 45,0                           | 141  | 43                                 | 150   |
| $\alpha$ 1 globuline | 4,0                    | 118    | 4,0                       | 116   | 4,0                                | 114   | 5,0                            | 119   | 6,0                            | 120  | 6,0                                | 132   |
| $\alpha$ 2 globuline | 13,0                   | 84     | 13,0                      | 82    | 12,0                               | 80    | 12,0                           | 84    | 14,0                           | 81,5 | 12,0                               | 78,5  |
| $\beta$ globuline    | 17,0                   | 90     | 18,0                      | 98    | 17,0                               | 85,5  | 13,0                           | 118   | 13,0                           | 120  | 15,0                               | 90    |
| $\gamma$ globuline   | 24,0                   | 135    | 25,0                      | 138   | 24,0                               | 130   | 19,0                           | 108   | 22,0                           | 107  | 24,0                               | 112,5 |
| Nbt                  | 142                    |        | 140                       |       | 117                                |       | 127                            |       | 123                            |      | 118                                |       |
| Nbc1                 |                        | 117,5  |                           | 117   |                                    | 118   |                                | 121,5 |                                | 119  |                                    | 118   |
| Nbc2                 |                        | 119,5  |                           | 122,5 |                                    | 114,8 |                                | 123   |                                | 121  |                                    | 122,5 |
| A                    | - 20,9                 |        | - 19,6                    |       | + 0,85                             |       | - 4,53                         |       | - 3,36                         |      | + 0,0                              |       |
| B                    |                        | - 18,9 | - 14,3                    |       | - 1,93                             |       | - 3,25                         |       | - 1,65                         |      | - 3,32                             |       |

Légende: voir tableau XXVIII.

fraction protéique considérée indépendamment, sont bien moins accentuées chez les sujets en cours de traitement (essais n<sup>os</sup> 125, 126 et 127) que chez les sujets en période de crise. Ceci s'observe pour toutes les fractions protéiques.

## II. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

Nous avons rassemblé dans le *tableau XXXI* le sens des variations des Nb, soit au-dessus, soit en dessous de la valeur moyenne déterminée sur des sérums de sujets supposés normaux.

TABLEAU XXXI

Sens des variations du Nb des différentes fractions protéiques du sérum  
dans les trois maladies étudiées  
Variations maximum enregistrées au cours de ces essais

| Affections étudiées               | Sérum-albumine      | Globulines   |              |            |          |
|-----------------------------------|---------------------|--------------|--------------|------------|----------|
|                                   |                     | $\alpha_1$   | $\alpha_2$   | $\beta$    | $\gamma$ |
| Néphrose<br>lipoïdique            | <br>(I)<br>- 28,8 % | <br>- 18,8 % | <br>+ 27,5 % | <br>- 17,1 | <br>≠    |
| Rhumatisme<br>articulaire<br>aigu | <br>+ 14,1          | <br>- 36,5   | <br>+ 18,8   | <br>- 20,7 | <br>+ 26 |
| Ictère<br>à<br>virus              | <br>- 9,85          | <br>- 6,55   | <br>≠        | <br>- 30   | <br>+ 31 |

- (1) Les chiffres indiquent les pourcentages d'écart par rapport au Nb des fractions d'un sérum normal

$$\frac{\text{Nb normal} - \text{Nb trouvé}}{\text{Nb normal}} \times 100$$

- (2) Les signes + ou - dont les différents pourcentages sont affectés représentent uniquement le sens de la variation.

Nous avons porté également sur ce tableau les écarts maximum enregistrés au cours des essais pratiqués dans les trois maladies étudiées.

Ces écarts sont exprimés en pourcentage par rapport aux Nb normaux. Ces écarts n'ont qu'une valeur indicative, le nombre de sérums étudiés étant beaucoup trop faible pour en tirer des conclusions plus fermes.

Nous pouvons observer que toutes les fractions présentent une modifications de leur valeur de Nb. Ces modifications sont quelquefois très faibles, mais le plus souvent importantes. Nous avons trouvé 4 cas ayant de 15 à 20 p. 100 d'écart et 4 autres de 20 à 30 p. 100 ; 2 cas au-dessus de 30 p. 100.

A) Dans la néphrose lipoïdique, les plus grands écarts observés ont été ceux de sujets dont la protéinurie était la plus élevée. Dans ces cas-là, le Nb de la sérum-albumine est descendu de 28,8 p. 100 au-dessous de sa valeur normale et le Nb de la globuline  $\alpha_2$  est augmenté de 27,5 p. 100.

Cette augmentation est peut-être en rapport avec l'augmentation du groupe  $\alpha$  glucoprotéique [65]. L'augmentation du Nb dans des maladies à réaction inflammatoire correspond à des affections où se manifeste également une augmentation de la teneur en glycoprotéines ; dans le rhumatisme articulaire, aigu par exemple, ou de la teneur en mucoprotéines dans les ictères à virus.

Par contre, avec une faible protéinurie, il n'y a pas de grands écarts avec les valeurs normales. Ces modifications s'observent aussi bien sur des malades différents qu'au cours de l'évolution chez le même sujet.

Nous avons déjà observé un abaissement du Nb de l'ensemble des protéines au cours de la néphrose lipoïdique. Abaissement très net en période de crise et retour vers la normale quand parallèlement les protéines urinaires diminuaient.

D'autre part, il ne s'agit peut-être que d'une coïncidence pour ces quelques cas, mais il n'en demeure pas moins nécessaire de signaler que le Nb de toutes les fractions varie en tendant à se rapprocher d'un Nb voisin de 100 (*tableau XXVIII*) (diminution du Nb de la sérum-albumine, des  $\alpha_1$  et  $\beta$  globulines, et augmentation parallèle du Nb des  $\alpha_2$  globulines).

En outre, les globulines des sérums normaux ont un Nb voisin de 100, dans la néphrose le Nb des  $\gamma$  globulines demeure voisin de 100 et c'est la seule fraction protéique dont le Nb paraît ne pas varier au cours de la néphrose.

Enfin, les écarts observés entre Nbt et Nbc<sub>2</sub> ont été inférieurs à 5 p. 100, sauf dans un seul cas.

B) Dans les 6 sérums de rhumatisme articulaire aigu, nous pouvons observer que toutes les fractions protéiques ont un Nb modifié.

Augmentation maximum de 14 p. 100 pour la sérum-albumine, de 18,8 p. 100 pour la globuline  $\alpha_2$  et de 26 p. 100 pour la  $\gamma$ -globuline. Les diminutions de la valeur de Nb sont pour la globuline  $\alpha_1$ : 36,5 p. 100 et pour la  $\beta$ -globuline: 20,7 p. 100.

Si l'on examine les résultats rassemblés au *tableau XXIX*, on peut constater que dès l'état chronique les Nb amorcent les variations qu'ils prendront pendant la crise; puis après traitement ils tendent à revenir à des valeurs voisines de la normale.

Dans tous les états inflammatoires on note une nette augmentation des glycoprotéines [108]. L'augmentation de la valeur des Nb semble ici encore correspondre à une augmentation du taux des glycoprotéines sériques.

Dans le seul cas de la maladie de Bouillaud, il semble que les Nb de la sérum-albumine et de la globuline  $\beta$  varient en sens inverse de ceux observés dans les cinq autres cas de rhumatisme. Mais il est encore à signaler que l'augmentation nette de la glycorotéine  $\alpha_2$  correspond ici aussi à une nette augmentation du Nb de la fraction protéique correspondante [104].

Il est curieux de constater d'après ces différents tableaux des maladies étudiées que Nb varie souvent en sens inverse dans la maladie puis la convalescence, comme si une réaction de l'organisme libérait des groupes cationiques quand ceux-ci sont diminués au cours d'une affection et inversement. Nous avons déjà pu observer un tel phénomène avec les variations du Nbt sur les sérums pathologiques.

Enfin, nous pouvons observer que les écarts entre Nbt et Nbc<sub>2</sub> sont toujours inférieurs à 5 p. 100.

C) Dans les ictères à virus que nous avons étudiés, les deux variations les plus importantes portent sur une diminution du Nb de la globuline  $\beta$  et une augmentation très importante du Nb des  $\gamma$ -globulines; nous avons trouvé une augmentation allant jusqu'à 31 p. 100.

La diminution sensible des glycoprotéines sériques dans les ictères infectieux [64] alors qu'elles tendent à augmenter dans les autres formes d'ictères, semble en relation avec la diminution générale de la valeur du Nb sauf en ce qui concerne les  $\gamma$ -globulines.

Nous pouvons constater que dans les deux dernières maladies étudiées se manifeste une nette augmentation de la valeur du Nb des  $\gamma$ -globulines, en rapport sans doute avec la nature infectieuse de la maladie.

Ici encore les variations les plus importantes sont au moment de la phase aiguë de la maladie.

L'essai n° 128 paraît, comme dans la maladie précédente, en opposition par certaines valeurs de Nb, aux cinq cas précédents. Il s'agit surtout du Nb de la sérum-albumine et de la globuline  $\alpha_1$ . C'est le sérum d'un vieillard et il a en outre été étudié huit jours après la fin du traitement. Peut-être pouvons-nous envisager la même hypothèse que précédemment pour expliquer ce balancement.

Les écarts observés entre Nbt et Nbc<sub>2</sub> sont inférieurs à 4 p. 100, sauf dans deux cas (essais n°s 123 et 124) où nous avons 18,9 et 14,3 p. 100 d'écart.

Nous pouvons constater que nous avons un écart semblable dans la néphrose lipoïdique (essai n° 112).

Pour ces trois cas, nous n'avons pas à envisager une hypothèse satisfaisante pour les expliquer.

---

## TROISIEME PARTIE

---



## CHAPITRE I

### **Emploi de l'acide phytique pour la détermination des groupes cationiques (basiques) des protéines urinaires**

---

Dans les sérums pathologiques nous avons observé que toutes les fractions protéiques présentaient des modifications de leur Nb, allant jusqu'à des variations de 30 p. 100 par rapport à leurs valeurs normales.

Dans la néphrose lipoïdique, les plus grands écarts observés ont été ceux des sujets dont la protéinurie était la plus élevée. Par contre, avec une protéinurie faible, nous n'avons pas noté de grands écarts avec les valeurs normales.

Ces modifications ont été observées aussi bien avec des malades différents qu'au cours de l'évolution chez un même sujet.

Différentes études ont montré que la néphrose lipoïdique donne lieu à des protéinuries qui peuvent être très importantes (70 g p. 1.000 ml).

L'électrophorèse sur papier [134] indique que les protéines urinaires renferment principalement des albumines. Le terme « facteur rénal » a été introduit dans la terminologie médicale pour désigner les pourcentages d'albumine dans les protéines sériques et dans les protéines urinaires. Son abaissement traduirait l'aggravation des lésions rénales.

A côté de l'albumine on observe des globulines dans les protéinuries de néphrose. Il s'agit surtout des  $\gamma$ -globulines ; les  $\alpha$  et  $\beta$ -globulines manquent dans la plupart des tracés. Ce fait est remarquable puisque ce sont ces deux globulines qui sont en excès dans le plasma. On peut rappeler, en effet, que dans le plasma l'électrophorèse montre une diminution de l'albumine et de la  $\gamma$ -globuline. Ces deux protéines, déficientes dans le plasma, se retrouvent dans les urines.

On peut d'ailleurs observer que la chute de l'albuminurie est toujours précédée d'une phase d'albuminurie importante, d'où le terme « fuite d'albumine » employé dans certains traités et mémoires.

Actuellement, l'origine des protéines urinaires est encore discutée.

Pour certains, les protéines urinaires proviendraient des protéines du plasma sanguin. Cette opinion est fondée sur les analogies de quelques-unes de leurs propriétés physiques : mobilité électrophorétique par exemple ou composition chimique. BECKMAN [17] et ses collaborateurs ont trouvé que dans les protéinuries et dans la fraction soluble dans l'acide trichloracétique 0,25 M, le constituant principal avait la mobilité électrophorétique d'une  $\alpha_1$ -globuline. D'autre part, l'hydrolysât de cette fraction contient les trois oses de la mucoprotéine du plasma (mannose, galactose, glucosamine).

D'autre part, on a montré que cette protéine, dans les urines de néphrose, n'était pas la mucoprotéine de l'urine normale qui se combine à certains virus [124]. Pour CHAPTAL et ses collaborateurs [27], la néphrose lipoïdique est une maladie rénale : dépolymérisation des mucoprotéines avec nécrose fibroïde ; à la faveur de cette destruction du filtre glomérulaire, l'albumine et les lipides sanguins pourraient passer dans le filtrat glomérulaire, et les cellules tubulaires ne réabsorberaient pas cette albumine.

Néanmoins, on a trouvé des protéines dans les urines de sujets normaux sans qu'il y ait une atteinte rénale. Ces protéines présentent une mobilité identique à la sérum-albumine du plasma [86].

En outre, elles présentent les mêmes réactions immunochimiques [87].

Des recherches par relargage [123], suivant le procédé de DERRIEN, effectuées sur les protéines urinaires dans le myélome multiple ont permis de mettre en évidence la diversité des protéines excrétées.

En outre, en administrant des acides aminés marqués (glycine isotopique), PUTNAM et HARDY [101] ont montré que la synthèse de la sérum-albumine anormale et de la protéine de BENCE-JONES excrétée semblait relever de processus indépendants.

Il n'est donc pas absolument évident que les protéines urinaires aient pour origine une simple diffusion sans remaniement des protéines plasmatiques.

Nous avons pensé à appliquer la méthode à l'acide phytique pour la détermination des groupes basiques (Nb) des protéines urinaires. De plus, nous pouvons comparer ainsi les valeurs obtenues pour les Nb des protéines sériques et des protéines urinaires chez un même sujet.

## A. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Nous avons effectué quelques essais préliminaires dans le but de rechercher l'action éventuelle des différents constituants urinaires sur le Nb d'une protéine.

### 1) INFLUENCE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS URINAIRES SUR LE Nb D'UNE PROTEINE

#### — Urines utilisées :

Ces essais ont été effectués sur des solutions contenant les principaux constituants urinaires. Les urines d'un sujet en bonne santé ont servi de référence. Ces urines ont été en outre utilisées dans la suite de nos recherches. Au cours de trois mois, elles ont été testées trois fois. Les constantes : chlorures [47], urée [48], acide urique [49], phosphates [50] et la recherche des mucoprotéines à l'acide nitrique [51] ont été déterminées suivant les protocoles des fiches techniques de Chimie Biologique de P. FLEURY.

Le pH a été mesuré avec un pHmètre Jouan, par rapport à un étalon de pH 6,5.

Nous avons rassemblé ces différentes constantes au tableau XXXII

TABLEAU XXXII  
Constantes des urines utilisées

| Mois | pH  | Urée            | Chlorures<br>(en ClNa) | Ac. urique | Phosphates<br>(en P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) | Muco-<br>protéines |
|------|-----|-----------------|------------------------|------------|---------------------------------------------------|--------------------|
| 1er  | 5,5 | 20 <sup>+</sup> | 11,0                   | 0,40       | 2,5                                               | 0                  |
| 2ème | 5,0 | 20              | 10,0                   | 0,42       | 2,5                                               | 0                  |
| 3ème | 5,5 | 20              | 11,0                   | 0,40       | 2,0                                               | 0                  |

(\*) Les quantités sont exprimées en g p. 1.000.

— *Solutions utilisées :*

A une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 contenant les protéines à la dose de 3 g p. 1.000, nous avons ajouté de l'urée, de l'urate d'ammonium, des phosphates et un peu d'oxalate d'ammonium dans les proportions indiquées ci-dessous :

| Solutions | ClNa | Urée | Urate d'ammonium<br>q.s.p. saturation à<br>pH 5,5 | PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K | Oxalate<br>d'ammonium |
|-----------|------|------|---------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1         | 9    |      |                                                   |                                  |                       |
| 2         | 9    | 20   |                                                   |                                  |                       |
| 3         | 9    | 20   | q.s.p. saturation                                 |                                  |                       |
| 4         | 9    | 20   | q.s.p. saturation                                 | 2,0                              |                       |
| 5         | 9    | 20   | q.s.p. saturation                                 | 2,0                              | 0,50                  |

Le pH de ces cinq solutions a été ajusté à 5,5 avec CIN N/10.

— *Protéines utilisées :*

Nous avons utilisé la sérum-albumine et des  $\gamma$  globulines, dont nous avons vérifié l'homogénéité par électrophorèse sur papier.

a) INFLUENCE SUR LE Nb D'UNE PROTÉINE DE SOLUTIONS DE COMPLEXITÉ CROISSANTE

1) *Protocole opératoire :*

Nous avons utilisé la précipitation phytique en suivant la technique décrite pour les protéines totales du sérum. A 20 ml de chacune des différentes solutions (soit 60 mg de protéines), nous ajoutons dans l'ordre : 1 ml d'inositohexaphosphate de sodium M/20 (\*), puis une solution de ClH 0,2 N, de telle sorte que nous amenons le pH à  $2,30 \pm 0,5$  (en moyenne 10 ml).

---

(\*) La solution I.H.P. Na M/20 renferme 8,333 g p. 100 de phytate de sodium à 41,35 p. 100 d'eau d'hydratation.

Un essai est effectué pour la détermination exacte du pH. Puis deux autres : l'un pour la détermination des protéines en déterminant l'azote total suivant la technique de Kjeldahl, le taux des protéines en est déduit en prenant comme coefficient 6,25 ; l'autre pour le dosage du phosphore phytique combiné, suivant le principe de Misson, d'après la technique de FLEURY et LECLERC [57].

## 2) Résultats obtenus :

Les différents résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau XXXIII*. Le Nb de la sérum-albumine et des  $\gamma$  globulines est identique à ceux habituellement admis [66 - 128] dans la littérature.

Il ne semble pas y avoir de modification dans le Nb des protéines. La complexité croissante tendant à rassembler les principales constantes urinaires ne paraît pas modifier la précipitation phytique.

TABLEAU XXXIII

Nb de la sérum-albumine, des  $\gamma$  globulines dans les solutions différentes

| Solutions N°        | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Sérum-albumine      | 140 | 141 | 138 | 142 | 140 |
| $\gamma$ globulines | 100 | 101 | 99  | 99  | 100 |

## 3) Discussion :

Nous avons testé les  $\gamma$  globulines en même temps que la sérum-albumine, car il s'avérait nécessaire de vérifier le comportement de cette protéine particulièrement labile.

On peut observer que nous avons ajouté à ces solutions de l'oxalate d'ammonium, alors que nous ne l'avions pas dosé dans les urines de référence. Nous l'avons ajouté, car les expériences d'HEUBNER et STADLER [69] et de TOFFOLI et MARELLI [127] ont montré que lors du dosage de l'I.H.P. Na par du perchlorure de fer, les phosphates, oxalates et urates présents dans le milieu pouvaient, suivant la quantité présent, soit se fixer sur le précipité, soit inhiber d'une façon plus ou moins importante la précipitation de l'acide phytique.

Nous avons pensé à une action possible conjuguée de ces divers éléments.

Il semble cependant nécessaire d'apporter une légère restriction en ce qui concerne l'acide urique ajouté. Celui-ci peut très bien ne pas avoir la même action que l'acide urique au sein des urines où il se trouve sous une forme combinée augmentant sa solubilité. De toute façon, nous n'avons pas pu déceler la présence d'azote non protéique dans la précipitation phytique au cours de ces essais.

#### b) INFLUENCE DE L'URINE DIALYSÉE

Après avoir étudié l'action éventuelle des différents constituants urinaires, il restait à voir si le support de ces éléments avait une action perturbatrice sur le Nb des protéines. Dans ce but, à l'urine du même sujet, dialysée contre de l'eau distillée pendant une nuit, nous avons ajouté es protéines à la même concentration que dans les essais précédents : 3 g p. 100.

Nous avons également utilisé le sérum d'un sujet présumé normal et celui d'un rhumatisant chronique. La précipitation phytique a été effectuée de la même façon. Nous avons rassemblé les résultats obtenus au *tableau XXXIV*.

TABLEAU XXXIV  
Influence de l'urine dialysée sur le Nb des protéines

| Protéines               | Nb<br>en sol. dans ClNa à 9 g<br>p.1000 | Nb<br>dans les urines préala-<br>blement dialysées |
|-------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Sérum-albumine          | 143                                     | 141                                                |
| γ globuline             | 99                                      | 99                                                 |
| Sérum normal            | 130                                     | 129                                                |
| Sérum de R.A. chronique | 140                                     | 141                                                |

Il ne semble pas y avoir de modifications dues aux urines préalablement dialysées, aussi bien sur des protéines normales (sérum-albu-

mine,  $\gamma$  globuline, sérum d'un sujet apparemment en bonne santé) que sur des protéines pathologiques (sérum d'un sujet atteint de rhumatisme articulaire aigu).

Il apparaît donc de ces deux expériences que les divers constituants urinaires et leur support semblent sans effet sur la teneur en groupes basiques des protéines ajoutées.

## 2) ACTION DE L'URINE SUR LE NB D'UNE PROTEINE

### 1) *Protocole opératoire :*

Nous avons procédé à des essais en mélangeant à 9 parties d'urine normale 1 partie de solution de protéine ou à 19 parties d'urine 1 partie de sérum. De façon à nous rapprocher progressivement d'une urine pathologique, nous avons utilisé successivement comme source de protéine :

a) Une solution à 30 g p. 1.000 de sérum-albumine ou de  $\gamma$  globulines humaines dans un soluté de chlorure de sodium à 9 p. 1.000.

b) Trois sérums de sujets présumés normaux.

c) Trois sérums pathologiques, le premier provenant d'un sujet atteint de rhumatisme articulaire aigu, les deux autres d'enfants affectés de néphrose lipoïdique.

Nous réalisons la précipitation phytique sur 20 ml du mélange urine-solution protéique, de la même façon que dans les essais précédents.

Nous avons effectué en parallèle trois précipitations phytiques :

1° La première sur la solution protéique, nous avons ainsi la valeur Nbt.

2° Une seconde sur le mélange urine-solution protéique, permet de calculer Nbm.

3° Enfin, après dialyse de quatre heures contre eau distillée du mélange urine-protéine, une dernière précipitation phytique nous donne la valeur du Nbd.

### 2) *Résultats obtenus :*

Nous avons rassemblé les résultats dans le *tableau XXXV*.

Nous pouvons observer une diminution nette de la valeur du Nb des protéines une fois mélangées aux urines. Par contre, après la dialyse, les valeurs de Nb montent sensiblement aux valeurs déterminées avant addition à l'urine.

D'autre part, si l'on compare la teneur en protéines obtenue par précipitation phytique avant et après addition à l'urine (colonnes 1 et 2 du *tableau XXXVI*), on note que la quantité de protéines calculées d'après la teneur en azote du précipité phytique à partir de l'urine est supérieure à celle introduite. Ce qui amène pour une même teneur en phosphore à une baisse du nombre de groupes basiques. Nous rappelons que la valeur du Nb est fonction du rapport P/N dans le précipité par l'acide phytique.

TABLEAU XXXV  
Teneur en groupes cationiques des fractions protéiques  
avant addition à l'urine et après addition à l'urine

| Protéines<br>ajoutées                                                     | Sérum<br>albumine | γ<br>Globu-<br>lines | Sérums normaux |       |       | Sérum<br>rhumatis-<br>me arti-<br>culaire<br>aigu | Sérum<br>de<br>néphrose<br>D | Sérum<br>de<br>néphrose<br>E |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|----------------|-------|-------|---------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                                           |                   |                      | A              | B     | C     |                                                   |                              |                              |
| Nb des protéines<br>en solution au<br>ClNa<br>Nbt                         | 141               | 100                  | 127            | 130   | 117   | 140                                               | 99                           | 95                           |
| Nb des protéines<br>ajoutées à l'uri-<br>ne non dialysée<br>Nbm           | 131               | 93,5                 | 110            | 112   | 100,5 | 118                                               | 81,5                         | 80,5                         |
| Nb des protéines<br>ajoutées à l'uri-<br>ne et dialysée<br>ensuite<br>Nbd | 145               | 99                   | 125            | 126,5 | 115   | 136                                               | 97,5                         | 93                           |

Il y avait donc tout lieu de supposer que le précipité acide phytique-protéine avait entraîné une substance azotée normalement présente dans l'urine, substance azotée évaluée en protéines d'après le dosage de l'azote total, d'où erreur par excès dans le calcul du taux de protéines.

Nous avons tout d'abord recherché si cette substance était éliminable par dialyse. Le mélange urine-solution protéique a été soumis à une dialyse dans un sac de cellophane contre de l'eau distillée, l'opération étant réalisée à la chambre froide entre 0° et + 4°. Après dialyse, nous précipitons les protéines par l'acide phytique. Les résultats figurent dans la colonne 3 du *tableau XXXVI*. Nous retrouvons sensiblement la quantité de protéines introduite. En effet, les différences

entre les valeurs des colonnes 1 et 3 ne dépassent pas l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales.

Par ailleurs, nous pouvons observer que les valeurs du Nb sont revenues après dialyse à des taux sensiblement identiques (tableau XXXV).

Il est cependant à noter que ces Nb sont toujours légèrement diminués dans le cas des six sérums.

#### a) RÔLE PARTICULIER DE L'ACIDE URIQUE

Nous avons cherché à identifier la nature de cette substance, adsorbable sur le précipité de phytate de protéine. Dans ce but, nous avons traité le précipité de phytate de protéine par 3 ml de  $\text{CCl}_3\text{-COOH}$  à 20 p. 100, puis nous avons effectué, après filtration et ajustage à 4 ml (tubes jaugés), la réaction colorée de FOLIN et DENIS à

TABLEAU XXXVI  
Précipitation par l'acide phytique des protéines ajoutées à l'urine

| Protéine ajoutée                        | 1<br>Poids de<br>protéine<br>ajoutée | 2<br>Protéines<br>précipitées<br>de l'urine<br>non dialysée | 3<br>Protéines<br>précipitées<br>de l'urine<br>dialysée | 4<br>acide urique<br>dans le<br>précipité de<br>l'urine non<br>dialysée | 5<br>quantité<br>de protéines<br>correspondant<br>à la teneur<br>en azote de<br>l'acide urique<br>du précipité |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sérum-albumine                          | 60,0                                 | 64,3                                                        | 59,5                                                    | 2,04                                                                    | 4,25                                                                                                           |
| globulines                              | 60,0                                 | 64,0                                                        | 59,0                                                    | 2,03                                                                    | 4,06                                                                                                           |
| Sérum normal A                          | 67,8                                 | 78,5                                                        | 68,0                                                    | 4,8                                                                     | 10,0                                                                                                           |
| Sérum normal B                          | 70,0                                 | 80,5                                                        | 70,0                                                    | 5,04                                                                    | 10,5                                                                                                           |
| Sérum normal C                          | 71,5                                 | 80,0                                                        | 72,1                                                    | 3,96                                                                    | 8,25                                                                                                           |
| Sérum de rhumatisme<br>articulaire aigu | 75,0                                 | 84,5                                                        | 75,0                                                    | 4,56                                                                    | 9,5                                                                                                            |
| Sérum de néphrose<br>lipéidique D       | 52,0                                 | 61,5                                                        | 52,5                                                    | 4,5                                                                     | 9,4                                                                                                            |
| Sérum de néphrose<br>lipéidique E       | 50,5                                 | 63,0                                                        | 50,5                                                    | 5,85                                                                    | 12,2                                                                                                           |

Les résultats du tableau sont exprimés en mg de substance dans 20 ml du mélange urine normale - solution de protéines. Le taux des protéines est évalué d'après la teneur en azote total du précipité considéré comme constitué de protéines à 16 % d'azote total.

l'acide phosphotungstique pour la caractérisation et le dosage de l'acide urique, suivant le protocole décrit par LAUDAT [79]. Les résultats figurent dans la colonne 4 du *tableau XXXVI*. Nous retrouvons régulièrement de l'acide urique dans le précipité à partir de l'urine non dialysée ; par contre, le précipité de l'urine dialysée n'en contient pratiquement pas.

Dans la colonne 5 du *tableau XXXVI*, nous avons calculé la quantité de protéines correspondant à la quantité d'azote retrouvée dans le précipité sous forme d'acide urique. Il apparaît nettement que l'erreur par excès, observée en précipitant les protéines de l'urine dialysée, provient de l'acide urique. En effet, les chiffres de la colonne 5 : azote de l'acide urique exprimé en protéines, sont pratiquement identiques aux différences entre les chiffres des colonnes 2 d'une part, et 1 ou 3 d'autre part : (2 — 1) ou (2 — 3) correspondant au poids de protéine calculé d'après la teneur en azote de la substance entraînée par le précipité acide phytique-protéine.

Pour toute cette série d'essais, nous avons utilisé le même mélange d'urine ; l'acide urique y fut dosé par la méthode d'Hopkins-Ronchèse, selon le protocole opératoire décrit par P. FLEURY [54]. Au cours de nos essais, 20 ml d'urine amènent 7,20 mg d'acide urique, dans le mélange urine-solution protéique.

#### b) IMPORTANCE D'UNE DIALYSE DE QUATRE HEURES CONTRE EAU DISTILLÉE

Après une dialyse de quatre heures, 50 p. 100 de l'acide urique passe à l'extérieur de la membrane. A ce moment, la quantité présente ne s'absorbe plus sur le précipité de phytate de protéine. En effet, comme on peut le constater (colonne 3 du *tableau XXXVI*), l'acide urique n'est plus décelable à l'azote. Si l'on traite également le précipité à l'acide trichloracétique, comme nous l'avons décrit précédemment, il n'y a aucune coloration à la réaction de Folin et Denis. Il semble donc qu'un seuil soit nécessaire pour que l'acide urique puisse s'absorber sur la combinaison acide phytique-protéine.

On pourrait penser qu'une dialyse prolongée plus longtemps serait plus sûre. Toutefois, une série d'essais nous ont montré qu'il n'y avait pas intérêt à prolonger la durée de la dialyse pour de multiples raisons :

a) Après douze à vingt-quatre heures de dialyse à 4°, les euglobulines précipitent.

b) GORBMAN [61] a signalé que le passage de l'urine à travers une membrane diminue sa perméabilité à l'eau. Cet effet de blocage

est plus important lorsque l'urine est riche en protéines. MAC GARRY, SEHON et ROSE [86] ont confirmé ce fait et observé qu'une partie des protéines adhéraît à la membrane.

c) La prolongation de la dialyse modifie le Nb des protéines, vraisemblablement par suite d'un début de dénaturation.

d) Enfin, l'expérience nous a montré (*tableau XXXIII* et colonne 2 du *tableau XXXVI*) que de faibles quantités d'acide urique présentes dans le milieu n'interféraient pas dans la détermination du Nb des protéines par précipitation phytique.

C'est pourquoi nous avons finalement conservé la dialyse de quatre heures au voisinage de 4°, adoptée à la suite de nos essais préliminaires.

Un dernier point doit être pris en considération : l'interférence possible des protéines normalement présentes dans l'urine. MÖRNER [82] en a décelé de 25 à 89 mg par jour. L'élimination quotidienne évaluée en moyenne à 39 mg par RIGAS et HELLER [106], serait en fait plus élevée : 71 mg selon MAC GARRY, SEHON et ROSE [86].

Nos essais furent réalisés sur des urines artificiellement chargées en protéines à des taux s'échelonnant de 2,52 à 2,75 g par litre.

Les résultats du *tableau XXXVI*, colonne 3, indiquent que les protéines normalement présentes dans l'urine ne paraissent pas avoir apporté de surcharge au précipité formé par l'acide phytique sur l'urine dialysée.

#### c) RECHERCHE D'UNE ACTION ÉVENTUELLE DE L'URINE SUR L'ÉLECTROGRAMME

Enfin, nous avons voulu vérifier que l'urine n'aurait aucune action sur le tracé électrophorétique. Bien que la quantité d'urée présente soit nettement inférieure à celle utilisée par G. PERLMANN [96], nous avons pensé qu'il serait intéressant d'effectuer l'électrophorèse en même temps que la détermination du Nb, comme nous l'avons pratiqué jusqu'alors.

Les essais furent réalisés sur les mélanges urine-sérum avant et après dialyse. Afin de ne pas avoir à procéder à une concentration ultérieure des protéines, nous ne mélangeons qu'une partie de sérum à neuf d'urine. L'électrophorèse sur papier est effectuée sur 0,01 ml du mélange. Nous avons procédé avec les trois sérums normaux (n<sup>os</sup> 131, 132, 133) et les trois sérums pathologiques : un de rhumatisme articulaire aigu (n<sup>o</sup> 134) et les deux sérums de néphrose lipidique (n<sup>os</sup> 135, 136).

TABLEAU XXXVII  
Influence de l'urine sur le protidogramme

| Fraction   | N° 131            |                 |                            | N° 132 |                 |                            | N° 133 |                 |                            |
|------------|-------------------|-----------------|----------------------------|--------|-----------------|----------------------------|--------|-----------------|----------------------------|
|            | Sérum             | Sérum/<br>urine | Sérum/<br>urine<br>dialysé | Sérum  | Sérum/<br>urine | Sérum/<br>urine<br>dialysé | Sérum  | Sérum/<br>urine | Sérum/<br>urine<br>dialysé |
| S A        | 56,0 <sup>+</sup> | 57,5            | 57,5                       | 53,0   | 55,0            | 54,0                       | 50,0   | 52,0            | 52,0                       |
| $\alpha_1$ | 5,0               | 4,5             | 5,0                        | 6,0    | 5,0             | 6,5                        | 7,0    | 7,0             | 6,0                        |
| $\alpha_2$ | 9,0               | 10,0            | 10,0                       | 11,0   | 11,0            | 11,5                       | 9,0    | 8,0             | 9,0                        |
| $\beta$    | 14,0              | 14,5            | 15,0                       | 13,0   | 14,0            | 14,0                       | 15,5   | 14,5            | 13,0                       |
| $\gamma$   | 16,0              | 13,5            | 17,5                       | 17,0   | 15,0            | 14,0                       | 18,5   | 18,5            | 20,0                       |

(\*) Valeurs exprimées en pourcentage.

TABLEAU XXXVIII  
Variations du protidogramme de sérums pathologiques en présence d'urine

| Fractions  | N° 134 (R A A)    |                 |                            | N° 135 (Néphrose lipidique) |                 |                            | N° 136 (Néphrose lipidique) |                 |                            |
|------------|-------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|
|            | Sérum             | Sérum/<br>urine | Sérum/<br>urine<br>dialysé | Sérum                       | Sérum/<br>urine | Sérum/<br>urine<br>dialysé | Sérum                       | Sérum/<br>urine | Sérum/<br>urine<br>dialysé |
| S A        | 48,0 <sup>+</sup> | 47,0            | 48,0                       | 41,0                        | 42,0            | 41,0                       | 39,0                        | 41,0            | 40,0                       |
| $\alpha_1$ | 6,0               | 5,0             | 5,50                       | 4,0                         | 3,5             | 4,0                        | 5,0                         | 4,5             | 4,5                        |
| $\alpha_2$ | 11,0              | 12,0            | 12,0                       | 35,0                        | 39,5            | 35,0                       | 35,0                        | 34,5            | 33,5                       |
| $\beta$    | 15,0              | 15,5            | 15,50                      | 15,0                        | 10,0            | 15,0                       | 18,0                        | 16,0            | 17,0                       |
| $\gamma$   | 20,0              | 20,5            | 19,0                       | 5,0                         | 5,0             | 5,0                        | 3,0                         | 4,0             | 5,0                        |

(\*) Valeurs exprimées en pourcentage.

Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans les deux *tableaux XXXVII* et *XXXVIII*. Ils ont tous conduit à des conclusions similaires : la dilution de l'urine, suivie ou non de dialyse, ne modifie pas le diagramme électrophorétique ; les proportions respectives des albumines et des diverses globulines ne sont pas changées et demeurent pratiquement identiques pour le sérum, sa dilution dans l'urine avant dialyse et cette dilution dialysée. En particulier, il n'a pas été décelé de variations observables des pourcentages d' $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  globulines. Les protéines normales de l'urine paraissent être à un taux trop faible pour modifier de façon perceptible le diagramme établi d'après électrophorèse sur papier.

## B. — TECHNIQUE PROPOSÉE POUR LA DÉTERMINATION DES GROUPES BASIQUES DES PROTÉINES URINAIRES

### 1) PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ET DIALYSE

Les urines sont transportées le plus rapidement possible dans une chambre froide ou à la glacière. LOISELEUR [69 - 70] a en effet montré qu'un chauffage, même à 37°-40°, modifiait le nombre des groupes fonctionnels libres des protéines sériques, traduisant ainsi un début de dénaturation. Les protéiques sériques mélangées à l'urine nous ont paru beaucoup plus faciles à dénaturer que lorsqu'elles sont présentes dans le sérum. Après un repos d'au moins une heure à + 2°, l'urine est centrifugée pour éliminer les dépôts uratiques. Nous en dialysons alors un volume connu dans un sac de cellophane pendant quatre heures contre de l'eau distillée à + 2° - + 5° régulièrement renouvelée. Le contenu du dialyseur est complété à un volume défini.

### 2) DÉTERMINATIONS SUR LA DIALYSE

#### a) ELECTROPHORÈSE SUR PAPIER

Nous avons suivi une technique sensiblement identique à celle de GRASSMANN, HANNING et KNEDEL [63]. Selon la teneur en protéines de l'urine, nous opérons soit directement sur le dialysat, soit sur ce

dialysat concentré par ultra-filtration ou dialyse contre polyvinylpyrrolidone. Nous suivons ensuite le même protocole opératoire que pour le sérum, les protéines étant colorées par une solution de bleu de bromophénol et bleu de bromothymol.

Comme l'a montré WOLVIUS [133], l'électrophorèse sur papier donne de bons résultats dans l'étude des protéines urinaires. D'après cet auteur, les résultats ne seraient valables qu'avec des concentrations en protéines de l'ordre de 20 p. 1.000. Or, R. RULLIÈRE [113] estime que l'électrophorèse se révèle suffisamment précise pour des protéinuries de 0,5 g à 8,0 g p. 1.000.

Des taux de protéinuries supérieurs à 2 g par litre sur l'urine dialysée ont donné des diagrammes permettant des colorations très lisibles.

#### b) DOSAGE APPROXIMATIF DES PROTÉINES

Il est réalisé par néphélémétrie [52], de façon à fixer l'ordre de grandeur des prises d'essais de réactifs pour la précipitation phytique. Le dosage précis des protéines sera réalisé en même temps que la détermination des groupes basiques, puisque nous le déduisons de la teneur en azote total du précipité phytique.

Le dosage néphélémétrique permet de calculer les doses d'acide phytique à employer, la précipitation n'est en effet complète que si l'on emploie 0,5 mg de phosphore phytique pour environ 1,5 mg d'azote protéique. Pour cette précipitation, nous prélevons 20 ml d'urine dialysée, lorsque la teneur en protéines est inférieure à 5 p. 1.000 ; le prélèvement est 10 ml pour une teneur de 5 à 10 g p. 1.000 et de 5 ml pour des teneurs supérieures à 10 g.

A la prise d'essai d'urine, nous ajoutons dans l'ordre 1 ml de phytate de sodium M/20, ClH N/5 q.s. pour obtenir un pH de 2,5 et de l'eau distillée q.s.p. 25 ml. Cet essai est réalisé en double dans deux tubes.

Lorsque l'on dispose d'une quantité suffisante d'urine dialysée, il est conseillé de procéder à un essai préliminaire dans un troisième tube pour fixer la dose de ClH N/5 nécessaire ; cette dose, pratiquement identique pour les sérums, varie assez nettement selon les urines. Après une heure de repos à la glacière, nous centrifugeons et poursuivons les essais comme il était indiqué au début de ce chapitre : dosage de l'azote total et de phosphore, ce qui permet de calculer d'une part le taux de protéines et d'autre part le rapport phosphore P/N, permettant d'évaluer la valeur de Nb.

c) MÉTHODE DE DÉTERMINATION DES GROUPEMENTS BASIQUES  
DES FRACTIONS PROTÉIQUES SÉPARÉES

Nous suivons un protocole opératoire identique à celui utilisé pour le fractionnement des protéines sériques.

Après une séparation électrophorétique sur quatre grandes bandes de papier, puis repérage de chacune des différentes fractions, les bandelettes de papier contenant ces fractions sont découpées et soumises à une élution par une solution de chlorure de sodium à 9 g p. 1.000.

Après cinq heures d'élution, l'éluat est complété à 5 ml seulement, cette quantité est inférieure aux 10 ml que nous avons indiqués pour les protéines sériques ; en effet, le taux des protéines urinaires est nettement inférieur à celui des sérums.

Les déterminations antérieures ont permis de connaître le taux de protéines totales et d'autre part l'électrophorèse sur papier ayant indiqué les proportions respectives de chaque fraction, il est possible de connaître approximativement les quantités de protéines présentes dans chaque éluat.

Nous avons déjà précisé l'importance du pH sur la précipitation de faibles quantités de protéines : avec une quantité de protéines voisines de 0,250 mg la zone de pH où la précipitation est totale et

| Protéines en<br>mg dans 2 ml<br>d'éluat | 0,250 | 0,720 | 0,900 | 1,50  | 3 à 6 |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Eluat                                   | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0   |
| Phytate de<br>sodium M/200              |       |       |       |       | 1,0   |
| Phytate de<br>sodium M/600              | 1,0   | 2,0   | 2,50  | 4,0   |       |
| OH <sub>2</sub><br>bidistillée          | 15,6  | 14,4  | 13,8  | 11,65 | 15,30 |
| ClN N/10                                | 1,40  | 1,60  | 1,70  | 2,35  | 1,70  |

où le pourcentage de phosphore fixé est maximum est à pH 2,18  $\pm$  0,02. En deçà et au delà, on ne précipite que 80 à 86 p. 100 des protéines. Le pourcentage de phosphore fixé varie dans le même sens.

Avec des quantités de 0,5 mg à 1,25 mg, la zone de précipitation est moins étroite ; il est nécessaire que le pH soit à 2,30  $\pm$  0,05. Enfin, pour des valeurs de l'ordre de 4 mg, la zone de précipitation devient plus large : pH 2,20 à pH 2,4.

Voici les doses de réactifs exprimées en ml, que nous avons employés pour la précipitation phytique (*Tableau page précédente*).

### 3) RESUME DES DIFFERENTS ESSAIS PRATIQUES SUR L'URINE

- 1) Après une heure à  $+ 2^{\circ}$ , centrifugation.
  - 2) Dialyse de quatre heures contre eau distillée, en chambre froide ( $+ 2^{\circ}$ ).
  - 3) Détermination de la protéinurie par néphélémétrie.
  - 4) Détermination de la teneur en groupes basiques des protéines totales.
  - 5) Fractionnement électrophorétique.
  - 6) Détermination du Nb de chaque fraction protéique séparée.
-

## CHAPITRE II

### **Comparaison de la teneur en groupes basiques des groupes protéiques du sérum et de l'urine au cours de la néphrose lipoidique**

---

Parmi les différentes affections que nous avons précédemment étudiées, la néphrose lipoidique est l'une de celles où d'une part nous avons pu observer des variations très importantes dans la valeur des Nb de chaque fraction protéique du sérum, et où une protéinurie abondante permet de suivre l'évolution de la maladie.

Nous avons donc pensé qu'il serait peut-être intéressant de comparer, d'après leur teneur en groupements basiques, les différentes fractions protéiques du sérum et des fractions correspondantes passant dans les urines.

Nous utilisons les urines d'une miction matinale du malade à jeun ; le sang est prélevé aussitôt après cette miction.

Nos essais ont porté sur cinq sérums et cinq urines provenant de deux sujets à différents stades de l'affection.

#### I. — RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons rassemblé les résultats aux *tableaux XXXVIII et XXXIX*. Nous envisageons d'abord les résultats obtenus avec les sérums, puis ceux avec les urines et nous procédons finalement à leurs comparaisons.

##### a) SÉRUMS

Nous avons pu observer dans les chapitres précédents qu'au cours de la néphrose lipoidique le Nb des protéines sériques totales était

TABLEAU XXXIX

Variations du Nb des différentes fractions protéiques du sérum dans la néphrose lipidique

| Protéinurie          | (1)                     |       | N° 131<br>Garçon 10 ans |       | (2)    |     | N° 133<br>Garçon 12 ans |       | N° 134<br>Garçon 12 ans |     |
|----------------------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|--------|-----|-------------------------|-------|-------------------------|-----|
|                      | N° 130<br>Garçon 10 ans |       | 2,50 %                  |       | 0,20 % |     | 4,00 %                  |       | 9,5 %                   |     |
|                      | %                       | Nb    | %                       | Nb    | %      | Nb  | %                       | Nb    | %                       | Nb  |
| Fractions            |                         |       |                         |       |        |     |                         |       |                         |     |
| Sérum-albumine       | 40,0                    | 138   | 39,0                    | 118   | 45,0   | 140 | 45,0                    | 140   | 29,0                    | 112 |
| $\alpha$ 1 globuline | 4,0                     | 118   | 6,0                     | 110   | 4,5    | 120 | 4,5                     | 121   | 4,0                     | 111 |
| $\alpha$ 2 globuline | 27,0                    | 85    | 29,0                    | 88    | 22,0   | 83  | 22,0                    | 83    | 39,0                    | 90  |
| $\beta$ globuline    | 13,0                    | 120   | 17,5                    | 120   | 16,5   | 119 | 16,5                    | 120   | 22,0                    | 113 |
| $\gamma$ globuline   | 16,0                    | 100   | 8,5                     | 98    | 12,0   | 97  | 12                      | 100   | 6,0                     | 100 |
| Nbt (3)              | 120                     |       | 110                     |       | 115    |     | 114                     |       | 102                     |     |
| NbcI (4)             | 117                     |       | 115,5                   |       | 119,5  |     | 119                     |       | 112,5                   |     |
| Nbc2 (5)             |                         | 114,5 |                         | 107,5 |        | 118 |                         | 118,5 |                         | 103 |

(1) Les n°s 130, 131 portent sur le même sujet à différentes étapes de la maladie.

(2) Les n°s 132, 133, 134 portent sur le même sujet à différentes étapes de la maladie.

(3) Nb des protéines totales du sérum.

(4) Nb calculé à partir de l'électrophorèse (sérum-albumine 143 — globulines 100).

(5) Calculé à partir des Nb de chacune des fractions protéiques, compte tenu de leur pourcentage à l'électrophorèse.

différent de la normale. Les écarts étaient d'autant plus accentués que la protéinurie était plus importante. Un net abaissement du Nb allait de pair avec une protéinurie abondante et une forte anomalie de la formule protéique. Comme nous l'avons déjà observé précédemment, chaque fraction protéique présente alors des modifications importantes dans la teneur en groupements basiques. Le Nb des  $\gamma$  globulines n'est pas modifié ; par contre, ceux des autres fractions subissent des fluctuations importantes. Le Nb de la sérum-albumine est diminué. Le Nb diminue d'une façon plus ou moins accentuée pour l' $\alpha_1$  globuline ; la diminution est plus faible pour les  $\beta$  globulines, inversement le Nb des  $\alpha_2$  globulines tend à augmenter.

Les résultats que nous avons rassemblés au *tableau XXXVIII* confirment ceux que nous avons déjà trouvés.

Les Nb des diverses fractions sont voisins des valeurs normales pour les essais n<sup>os</sup> 130 et 132, qui correspondent à des périodes de rémission avec protéinurie faible.

Dans les essais n<sup>os</sup> 131 et 134, un taux de protéines supérieur à 2 g par litre va de pair avec un net abaissement du Nb des albumines et des  $\alpha_1$  globulines et un abaissement peu marqué des  $\beta$  globulines. Le Nb des  $\alpha_2$  globulines augmente légèrement et celui des  $\gamma$  globulines demeure normal.

La corrélation entre la protéinurie et les modifications du Nb n'est cependant pas régulière ; dans l'essai n<sup>o</sup> 133, une protéinurie de 4,0 g par litre ne s'accompagne pas de modifications significatives des Nb des diverses fractions protéiques du sérum. Néanmoins, il est admis que le taux des protéines urinaires est l'épreuve de laboratoire qui correspond le mieux au degré d'évolution de la maladie (GILLY et BOUSQUET [59]).

L'essai n<sup>o</sup> 134 est celui où les variations des Nb sont les plus accentuées, il s'y associe la protéinurie la plus élevée et la formule protéique la plus anormale.

## b) URINES

Quelle que soit l'importance de leur élimination, les protéines renferment de 80 à 92 p. 100 d'albumines et des  $\gamma$  globulines. Nous n'avons pu déceler d'autres globulines ; ni l' $\alpha_1$  globuline qui ferait partie des protéines normales urinaires, ni d' $\alpha_2$  globuline ; d'ailleurs JAYLE et BOUSSIER [74] signalent qu'ils n'ont décelé de quantité appréciable d' $\alpha_2$  globuline (identifiée ensuite à l'haptoglobine) que dans une seule urine avec 30 échantillons d'urines néphrotiques de malades différents.

TABLEAU IX

Variations du Nb des différentes fractions protéiques urinaires dans la néphrose lipéidique

|                    | N° 130<br>Garçon 10 ans<br>(1) |     | N° 131<br>Garçon 10 ans |     | N° 132<br>Garçon 12 ans |     | N° 133<br>Garçon 12 ans |     | N° 134<br>Garçon 12 ans |     |
|--------------------|--------------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
|                    | 0,5 %                          |     | 2,5 %                   |     | 0,20 %                  |     | 4,00 %                  |     | 9,5 %                   |     |
| Fractions          | (2)                            |     |                         |     |                         |     |                         |     |                         |     |
|                    | %                              | Nb  | %                       | Nb  | %                       | Nb  | %                       | Nb  | %                       | Nb  |
| Sérum-albumine     | 90                             | I29 | 81                      | III | 92                      | I32 | 89                      | I26 | 88                      | II4 |
| $\gamma$ globuline | 10                             | IO8 | 19                      | IOI | 8                       | IO3 | II                      | IO3 | I2                      | IOO |
| Iibtu (3)          | I29                            |     | IO2                     |     | I24                     |     | II9                     |     | II4                     |     |
| Nbc2u (4)          | I26,8                          |     | IO8                     |     | I29                     |     | I23                     |     | II3                     |     |

(1) Les urines correspondent aux sérums du précédent tableau.

(2) Pourcentage obtenu à l'électrophorèse.

(3) Nb total des protéines urinaires.

(4) Calculé à partir des Nb de chacune des fractions protéiques, compte tenu de leur pourcentage à l'électrophorèse.

Les albumines urinaires ont des Nb inférieurs à la normale dans tous les sérums, tandis que les  $\gamma$  globulines ont des Nb s'étaguant de 100 à 108, légèrement supérieurs à la normale (95 - 100), des  $\gamma$  globulines sériques.

### c) COMPARAISON DES SÉRUMS ET URINES

Nous avons rassemblé dans le *tableau XL* les variations maximum que nous avons pu observer au cours de nos essais (et ceux relevés au chapitre précédent).

Dans le cas des protéines sériques, la variation est calculée de la façon suivante :

$$\frac{\text{Nb normal} - \text{Nb trouvé}}{\text{Nb normal}} \times 100$$

Dans le cas des protéines urinaires, si l'on admet que dans les urines normales il peut y avoir une *sérum-albumine* plasmatique à Nb = 143, on pourra déterminer l'amplitude de la variation par :

$$\frac{\text{Nb normal} - \text{Nb trouvé}}{\text{Nb normal}} \times 100$$

TABLEAU XLI

Variations et valeurs extrêmes du Nb  
obtenues pour les différentes fractions protéiques du sérum et de l'urine  
au cours des néphroses lipoïdiques étudiées

| Variations maximum<br>observées sur                                      | Sérum-<br>albumine | Globulines |            |          |          |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------|------------|----------|----------|
|                                                                          |                    | $\alpha$ 1 | $\alpha$ 2 | $\beta$  | $\gamma$ |
| Résultats obtenus<br>au chapitre II<br>2ème partie<br>Protéines sériques | - 28,8 %           | - 18,8 %   | + 27,5 %   | - 17,1 % | ≠        |
| Résultats du<br>tableau dans ce<br>chapitre<br>Protéines sériques        | - 21,7 %           | - 9,0 %    | + 11,2 %   | - 8,15 % | ≠        |
| Protéines urinaires                                                      | - 22,4 %           |            |            |          | ≠        |

Les signes + ou - dont les différents pourcentages sont affectés représentent uniquement le sens de la variation.

L'examen du *tableau XL* montre des variations importantes.

Nous avons pu observer des fluctuations allant jusqu'à près de 30 p. 100 de la valeur normale du Nb.

L'écart maximum pour la sérum-albumine urinaire est une baisse voisine de 22 p. 100. Bien que moins importante que la diminution observée avec la sérum-albumine plasmatique, elle est cependant notable.

Le Nb des globulines de l'urine est faiblement supérieur ou identique à celui des  $\gamma$  globulines des sérums correspondants ; à ce point de vue, il ne paraît pas y avoir de différences très significatives entre les  $\gamma$  globulines du sérum et de l'urine.

TABLEAU XLII

Comparaison des Nb des différentes fractions protéiques du sérum et des urines dans la néphrose lipoïdique

|                          | N° 130<br>Garçon 10<br>ans |       | N° 131<br>Garçon 10<br>ans |       | N° 132<br>Garçon 12<br>ans |       | N° 133<br>Garçon 12<br>ans |       | N° 134<br>Garçon 12<br>ans |       |
|--------------------------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
|                          | Sérum                      | urine | Sérum                      | urine | Sérum                      | urine | Sérum                      | urine | Sérum                      | urine |
| Protéines en g.p.1000 ml | 40,0                       | 0,5   | 39,0                       | 2,50  | 62,5                       | 0,20  | 43,40                      | 4,0   | 32,0                       | 9,5   |
| Sérum-albumine           | 138                        | 129   | 118                        | 111   | 140                        | 132   | 140                        | 126   | 112                        | 114   |
| $\gamma$ globuline       | 100                        | 108   | 98                         | 101   | 97                         | 103   | 100                        | 103   | 100                        | 100   |

Il en est tout autrement pour les albumines *tableau XLI*. Dans les essais n°s 130, 132, 133, les Nb des sérum-albumines se situent de 138 à 140, valeurs légèrement inférieures à la normale. Les Nb des albumines urinaires vont de 126 à 132, valeur très inférieure à celle de la sérum-albumine normale : 143. Dans l'essai n° 131 où le Nb de la sérum-albumine est nettement abaissé à 118, il s'élimine une albumine d'un Nb un peu inférieur : 111. Enfin, dans l'essai n° 134 où le Nb de la sérum-albumine est abaissé à 112, il s'élimine une protéine à Nb sensiblement identique : 114.

## II. — DISCUSSION

Ces résultats sembleraient indiquer que le rein élimine une fraction protéique anormale, identique à celle du sérum si cette dernière

est très anormale, et dont le Nb est très inférieur à celui de l'albumine sérique si le Nb de cette dernière n'est que faiblement abaissé. Il est impossible de procéder à une généralisation hâtive basée sur cinq séries d'essais pour en déduire qu'au cours de la néphrose le rein élimine préférentiellement des sérum-albumines anormales à Nb abaissé.

La nature des fractions protéiques au cours de la néphrose a déjà suscité de multiples travaux aux résultats parfois un peu contradictoires (ENSELME et DREYFUS [43]). L'on tend en général à admettre qu'au cours de la néphrose lipoidique la sérum-albumine n'est pas notablement différente de celle du sujet normal, ce qui s'est traduit par l'expression « fuite d'albumine » couramment utilisée dans les mémoires et traités. Pourrait-on envisager qu'il ne s'agit point de la fuite d'une albumine normale mais de l'élimination d'une albumine anormale ? Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'y a pas encore d'arguments décisifs. Si la néphrose résulte uniquement d'une lésion rénale avec augmentation de la perméabilité glomérulaire aux protéines (CHAPTAL, JEAN, COMPO et ABRAM [27]), il est difficile de concevoir comment le rein laisse diffuser les albumines et  $\gamma$  globulines en retenant les fractions intermédiaires par leur poids moléculaire que représentent les  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$  globulines. D'autre part, si l'on admet que le rein laisse diffuser dans les glomérules et ne réabsorbe pas dans les tubuli une sérum-albumine anormale, il est également difficile de concevoir pourquoi il n'élimine pas de la même façon les  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$  globulines à Nb anormal et excrète par contre des  $\gamma$  globulines à Nb sensiblement normal.

Dans nos cinq essais, le rapport albumines/globulines est de 4,2 pour l'une des urines et très proche de 9,0 pour les quatre autres ; il s'échelonne de 3,6 à 4,8 pour les sérums correspondants. Ainsi dans les urines, le rapport d'une protéine à Nb anormal à celui d'une protéine à Nb normal varie assez peu d'un sujet à l'autre, alors que les taux de protéines par litre oscillent entre 0,20 g et 9,50 g.

Une troisième interprétation intermédiaire peut enfin être proposée. Des récents travaux indiquent l'existence de plusieurs fractions dans les albumines du sérum ; ces fractions ont été signalées après électrophorèse sur gélose (URIEL et GRABAR [129]) ou différenciées par analyse immuno-électrophorétique (LAPRESLE [78] et SCHEIDEGGER [116]). Ainsi la sérum-albumine n'aurait le Nb voisin de 143, que nous avons régulièrement retrouvé avec des sérums de sujets en bonne santé, que par un effet statistique. Elle pourrait renfermer une sous-fraction à Nb inférieur qui serait produite en plus fortes proportions au cours de la néphrose et serait excrétée préférentiellement dans l'urine. Cette interprétation se concilierait alors avec le fait,

signalé par BURTIN [23], de l'identité immuno-chimique entre les albumines des néphrotiques et une albumine extraite du sérum normal par la méthode VI de COHN.

Quel que soit le bien-fondé de ces interprétations possibles, il n'en demeure pas moins que l'emploi de l'acide phytique, pour déterminer le Nb des protéines, fournit un test de chimie clinique permettant de suivre l'évolution d'une néphrose lipoïdique ; ce test permet de compléter ceux basés sur le dosage des protéines urinaires et l'électrophorèse du sérum.

---

## QUATRIEME PARTIE

---



## DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS

---

Nous avons rassemblé dans ce chapitre les objections diverses qui ont pu être soulevées par différents interlocuteurs au cours de nos recherches. Nous y avons également adjoint les données de nombreux chercheurs sur la composition chimique des protéines normales ou pathologiques, et les discussions qu'elles soulèvent.

### I. — LA RÉACTION EST TOUJOURS STECHIOMÉTRIQUE

Le premier argument qui nous a été opposé, et certainement le principal, portait sur la stéchiométrie de la combinaison acide phytique-protéine.

Au début de ce travail, nous avons rappelé les travaux de R. BARRÉ [9 - 11 - 12], BARRÉ et COURTOIS [13] et ceux effectués par ces auteurs en collaboration avec G. WORMSER [16]. Ils ont étudié la combinaison acide phytique-protéine sous tous ses aspects, dans différents milieux et en présence de nombreux effecteurs.

Il nous suffira ici de rapporter leurs conclusions sur les combinaisons acide phytique-protéine ; les protéines étudiées étant la sérum-albumine humaine, l'amando-albumine et la salmine.

Ils ont pu mettre en évidence les phénomènes suivants (que nous avons d'ailleurs déjà indiqués au début de ce travail) :

1) Dans le cas de la salmine et à pH variable, la combinaison de l'acide phytique avec la protéine ressemble à la salification d'une base faible par un acide fort. Il en est de même de la combinaison de l'acide phytique avec les autres protéines étudiées, mais à pH fixe.

2) La sérum-albumine et l'amando-albumine, contrairement à la salmine, possèdent des carboxyles libres, capables de contracter des liaisons intramoléculaires avec des groupements basiques. La combi-

naison de l'acide phytique avec ces deux protéines s'effectue selon deux processus successifs :

a) Le premier ressemble, comme dans le cas de la salmine, à la salification d'une base faible par un acide fort. Ce genre de combinaison ne suit pas la loi d'action de masse.

b) Le second, qui se produit entre pH 5,0 et 3,0 environ, est une réaction d'équilibre régie par la loi d'action de masse.

Ils ont déduit du fait que la salmine ne possède pas de carboxyles libres, contrairement aux deux autres protéines, que le second processus (b) pouvait lui-même être la résultante de deux phénomènes distincts :

1° Ionisation des liaisons intramoléculaires formées entre des carboxyles libres et des groupements basiques. Les carboxyles sont vraisemblablement les deuxièmes carboxyles des acides aspartique et glutamique, dont les pK sont voisins de 4,0. Cette ionisation est une réaction d'équilibre régie par la loi d'action de masse.

2° Salification par l'acide phytique des groupements basiques de la protéine au fur et à mesure de leur libération par ionisation. Cette salification ne suit pas la loi d'action de masse.

En milieu acide à pH  $2,30 \pm 0,5$ , avec une quantité d'acide phytique telle que l'on ait environ 0,5 mg de phosphore pour 1,5 mg d'azote protéique, il y a salification stœchiométrique des groupements ionisables basiques des protéines.

## II. — LA PRÉCIPITATION PHYTIQUE EST SÉLECTIVE

### 1) LES PROTEINES EN PRESENCE DE LEURS PRODUITS DE DEGRADATION

a) Au premier chapitre, nous avons signalé que l'acide phytique précipitait les protéines d'une préparation commerciale de  $\gamma$  globulines, et qu'après vingt-quatre de repos à la glacière à  $+ 4^{\circ}$  la liqueur surnageante se troublait à nouveau. Ce nouveau précipité représentait vraisemblablement des polypeptides. Il y avait ainsi, après vingt-quatre heures, identité entre les précipités obtenus d'une part avec l'acide phytique et d'autre part avec l'acide trichloracétique.

Nous avons signalé qu'après une heure de contact, l'acide phytique avait ainsi insolubilisé la totalité des protéines intactes.

D'autres auteurs ont signalé la sélectivité de l'acide phytique.

b) C'est ainsi que J.-E. COURTOIS et Mlle HUIBAN [35] ont utilisé l'acide phytique au cours de la dégradation pepsique de l'édésine. Les albumines et peptones résultants ne sont pas précipités. Ces auteurs ont pu ainsi étudier systématiquement l'activité de préparations pharmaceutiques de pepsine.

c) En outre, C. DUMARZET et ses collaborateurs [39] ont employé l'acide phytique dans l'étude des protéases.

Ils ont montré que l'acide phytique devait être considéré comme un réactif spécifique de la précipitation des protéines intactes, même lorsqu'elles sont accompagnées du mélange de leurs produits de dégradation par les enzymes protéolytiques. C'est ainsi (et nous avons au cours du premier chapitre insisté sur ce point) que des polyphosphates de longues chaînes [40], appelés communément « métaphosphates », de sodium précipitant des composés basiques, précipitation difficilement totale et pas toujours stœchiométrique, s'opposent à la sélectivité de l'acide phytique.

## 2) LES PROTEINES LIEES (AUX STEROLS, AUX LIPIDES, AUX ACIDES GRAS, AUX PIGMENTS

La nature de la liaison entre protéines et lipides est mal connue. Les modes de liaison sont certainement multiples et, pour une même molécule, ils varient sans doute, dans une certaine mesure, au cours du métabolisme. Les phénomènes de solvation et d'association y jouent certainement un rôle. Le simple jeu des forces de Van der Waals ou l'union des ponts hydrogènes interviennent à côté des liaisons résistant à des procédés d'analyses relativement énergiques.

Certains ont pu faire l'observation suivante : le cholestérol, les lipides ou les acides gras peuvent bloquer des groupements réactionnels, ceux-ci échapperaient alors au test phytique. La valeur du Nb serait ainsi modifiée : il serait alors possible de penser, d'une façon erronée, à la présence d'une protéine anormale.

En effet, la sérum-albumine humaine (fraction V de COHN) contient 40 p. 100 de lipides totaux et 13 p. 100 de cholestérol. L' $\alpha_1$  lipoglobuline, 35 p. 100 de lipides et 12 p. 100 de cholestérol d'après COHN [31]. La  $\beta$  lipoglobuline contiendrait 77 p. 100 de lipides totaux et, suivant ONCLEY et coll. [94], 31 p. 100 de cholestérol.

Ce sont là des quantités importantes et si ces substances lipidiques et stéroliques bloquent des groupements cationiques, on doit avoir une forte modification dans la valeur du Nb par la précipitation phytique.

a) PROTÉINES LIÉES AUX STÉROLS

Nous avons déjà observé au cours de recherches antérieures que le cholestérol présent dans le sérum était entièrement entraîné dans le précipité de phytate de protéine et qu'il était en outre possible de l'extraire par du chloroforme en prenant le soin de diviser le précipité avec du sable lavé. La solution chloroformique servait au dosage du cholestérol, suivant la méthode colorimétrique habituelle de LIEBERMANN [82].

TABLEAU LXIII  
Influence du cholestérol sur le Nb des protéines

| Sérums de sujets<br>présumés normaux | Cholestérol d'après<br>la méthode de SPERRY<br>SCHOENHEIMER en g.p.<br>1000 | Cholestérol extrait<br>du précipité de<br>phytate de protéine<br>par $\text{CHCl}_3$ en g.p.<br>1000 | Nbt<br>des protéines<br>totales<br>sériques |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| A                                    | 2,10                                                                        | 2,00                                                                                                 | 125                                         |
| B                                    | 2,70                                                                        | 2,60                                                                                                 | 124                                         |
| C                                    | 2,40                                                                        | 2,10                                                                                                 | 123                                         |
| D                                    | 2,70                                                                        | 2,50                                                                                                 | 126                                         |
| E                                    | 3,00                                                                        | 3,30                                                                                                 | 125                                         |
| F                                    | 2,50                                                                        | 2,60                                                                                                 | 125                                         |
| G                                    | 2,55                                                                        | 2,50                                                                                                 | 123                                         |
| H                                    | 3,50                                                                        | 3,40                                                                                                 | 126                                         |

Pour comparer ces résultats, nous avons effectué en parallèle le dosage du cholestérol sanguin, selon la méthode de SCHOENHEIMER et SPERRY [118], suivant le protocole décrit par K. HINSBERG et K. LANG [71].

Cette dernière méthode semble, d'après DEVIS [38], donner de meilleurs résultats que les autres techniques habituellement employées dans les laboratoires hospitaliers.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau LXII*. Nous pouvons observer que tout le cholestérol est entraîné sur le précipité

phytique, mais que ses variations, même importantes, n'entraînaient pas de modification dans la valeur moyenne du Nb<sub>t</sub>.

#### b) PROTÉINES LIÉES AUX LIPIDES

L'objection soulevée par la présence des lipides dans les fractions protéiques isolées est importante. En effet, par la méthode immuno-chimique, URIEL et GRABAR [129] ont nettement fait ressortir les différentes fractions lipidiques liées avec diverses fractions protéiques.

Or, au chapitre précédent (chapitre I, deuxième partie), nous avons insisté sur le fait que les valeurs de Nb des fractions protéiques des sérums de sujets présumés normaux se sont montrées identiques à celles calculées d'après la teneur en acides aminés basiques proposées par EDSALL [41]. C'est ainsi que pour les fractions  $\beta$  lipoglobulines et  $\alpha_1$  lipoprotéines, nous avons trouvé un Nb sensiblement identique à celui calculé :

|                                                                      |       |
|----------------------------------------------------------------------|-------|
| — Nb de l' $\alpha_1$ globuline d'après le test à l'acide phytique : | 122   |
| — Nb calculé d'après la teneur en bases texoniques :                 | 123,4 |
| — Nb de la $\beta$ globuline d'après le test à l'acide phytique :    | 123   |
| — Nb calculé d'après la teneur en bases hexoniques :                 | 124,9 |

Nous avons déjà indiqué ces différentes valeurs et nous avons également expliqué la légère différence entre la valeur de Nb trouvé pour l' $\alpha_2$  globuline et celle calculé d'après la teneur en acides aminés basiques.

Nous pouvons ainsi observer que même en présence de lipoprotéines la précipitation phytique est sélective et stœchiométrique puisque nous retrouvons les teneurs en groupements cationiques basiques avec des écarts inférieurs à 5 p. 100.

Nous devons cependant faire une remarque en ce qui concerne les résultats du *tableau II* (au premier chapitre). Le Nb trouvé par précipitation phytique de l' $\alpha_1$  lipoprotéine était de 113 et celui calculé d'après la teneur en acides aminés basiques de 118. Nous pouvons observer un écart de 4,25 p. 100, ce qui est faible.

Mais la différence est plus grande pour la  $\beta$  lipoprotéine ; en effet, le Nb trouvé était 107 et le Nb calculé 118. La différence est légèrement supérieure à 10 p. 100.

La différence de composition provient de la méthode de fractionnement. L'écart enregistré pour la  $\beta$  globuline résulterait sans doute d'une dénaturation importante de cette protéine. Plusieurs congélations suivies de réchauffement lors du transport et de différents essais pourraient laisser supposer un repliement de la molécule sur elle-

même. Cette dénaturation amenant une diminution des groupements réactionnels.

En effet, il est un point très important à considérer : c'est la labilité extrême d'une protéine dès qu'elle est sortie de son milieu biologique. C'est cette instabilité qui nous a d'ailleurs obligés à fractionner les sérums en chambre froide.

### c) PROTÉINES LIÉES AUX ACIDES GRAS

Les protéines isolées et cristallisées contiennent des acides gras. La sérum-albumine humaine cristallisée de COHN [31] contient des acides gras, qui restent fixés et résistent aux méthodes de séparation relativement énergiques.

La sérum-albumine, que nous avons étudiée (\*), contenait 2 molécules d'acide gras pour 1 molécule de protéine, ce qui est très faible si l'on compare les poids moléculaires.

La présence de ces acides gras ne nous a pas gênés, puisque nous avons retrouvé les valeurs théoriques habituellement admises pour la sérum-albumine (143 groupes basiques pour  $10^5$  g de protéines).

Il était cependant possible de penser que lors d'une affection, néphrose lipoïdique par exemple, l'augmentation importante d'acide gras fixé sur la sérum-albumine expliquerait les diminutions souvent importantes observées pour les valeurs du Nb.

Mais il ne semble pas que les acides gras, même en très grandes quantités, puissent empêcher la salification des groupements basiques de la protéine par l'acide phytique à  $\text{pH } 2,30 \pm 0,5$ . En effet, nous avons calculé le Nb d'une sérum-albumine avant et après addition d'oléate de sodium.

A une solution de sérum-albumine à 27,50 mg pour 100 ml de chlorure de sodium (9 g p. 1.000), nous avons ajouté 1 g pour 100 d'oléate de sodium. Après une heure de repos à la température du laboratoire, la précipitation phytique a été effectuée sur la solution protéique seule et sur la solution protéique contenant l'oléate.

La valeur du Nb a été identique dans les deux cas ( $\text{Nb} = 143$ ). Seule à l'électrophorèse la protéine associée à l'oléate de sodium a présenté une vitesse de migration légèrement ralentie.

Il apparaît donc possible de penser que les variations enregistrées pour les protéines, au cours de la néphrose lipoïdique, sont dues à une

---

(\*) Sérum-albumine fournie par MM. R. ARDRY et J. STORCK, du Centre de Transfusion de l'Armée.

modification de la teneur en bases hexoniques et non pas au blocage des groupements  $\text{NH}_2$  par les acides gras éventuellement présents.

#### d) LIAISON PROTÉINES ET PIGMENTS

Les essais précédents ont montré la sélectivité de l'acide phytique. Dans les différents cas de sérums ictériques, il était possible de penser que la bilirubine liée à la sérum-albumine pouvait masquer chez celle-ci des groupements réactionnels basiques.

R. BOURILLON [20] a montré la solidité du complexe sérum-albumine-bilirubine.

Nous avons cependant pu observer que l'addition de la bilirubine (bilirubinate ou bile), si elle diminue la vitesse de migration électrophorétique de la sérum-albumine [21], ne bloque pas de groupements basiques. Ceux-ci restent salifiables par l'acide phytique. En effet, avant et après addition de bilirubine (\*), le Nb de la sérum-albumine est resté à 143.

Ce fait est particulièrement important. En effet, dans les différentes affections hépatiques où la sérum-albumine peut être combinée à divers pigments, ceux-ci semblent sans effet sur le test à l'acide phytique.

### 3) CONCLUSIONS

Il semble que l'on puisse considérer que l'acide phytique, dans tous les cas étudiés, peut salifier les groupements ionisables basiques des protéines.

Il apparaît que la réaction est toujours stœchiométrique, que l'acide phytique précipite sélectivement les protéines intactes. En outre, il semble que l'acide phytique n'est pas gêné par différents composés pouvant être liés aux protéines. La salification paraît s'effectuer sans être modifiée par aucune des substances (stérols, lipides, acides gras ou pigments), qui présentent cependant pour l'analyste des liaisons très solides avec les protéines auxquelles elles sont associées.

Nous pensons ainsi que le test à l'acide phytique nous a indiqué, dans tous les cas étudiés, la teneur en groupements aminés basiques des protéines, c'est-à-dire la teneur en bases hexoniques.

---

(\*) A une solution de sérum-albumine à 30 g p. 1.000 dans du sérum physiologique, nous avons ajouté du bilirubinate de sodium à la concentration de 200 mg p. 1.000. Nous avons effectué une précipitation phytique avant et après addition de pigments.

### III. — LE PROBLÈME DES PROTÉINES ANORMALES

Les résultats obtenus avec l'acide phytique remettent en question le problème des protéines anormales. Cette question est toujours âprement discutée. On peut dire que cinquante pour cent environ des chercheurs sont favorables à l'existence de protéines anormales et que le reste y est hostile.

WUHRMANN [135] estime que « actuellement nous ignorons encore si nous nous trouvons en présence de variations quantitatives des différentes fractions ou si celles-ci s'accompagnent de véritables modifications ».

WALDENSTRÖM [130 bis] pose la même question et pense que les protéines appelées pathologiques ne sont que des protéines normales mais quantitativement très augmentées.

Il semble cependant que les travaux de ces dernières années montrent une tendance accentuée vers l'existence de protéines anormales, comme il est indiqué dans le récent ouvrage de BLOCK et WEISS [18 bis].

Un point très important doit cependant être rappelé : il n'y a pas deux auteurs qui proposent des résultats identiques pour une même protéine. Les résultats ne sont qu'approchés. On peut donc déjà penser que les différentes légères observées entre les chiffres de MÜTING [93] et de BRAND [24], rapportés par EDSALL [41] et ceux de CUNNINGS et FLYNN [36], représentent des variations physiologiques qui existeraient déjà à l'état normal et dont l'ampleur pourrait être diminuée par le fait que les protéines étudiées proviennent souvent de « pools ».

#### 1) LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

##### a) MÊME TENEUR EN ACIDES AMINÉS

Certains auteurs, et parmi eux SMITH, BROWN et collaborateurs [119], ont montré que dans les maladies de Kahler les protéines anormales ( $\gamma$  ou  $\beta$  suivant l'affection) présentaient une teneur en acides aminés supérieure à la normale ; mais le pourcentage de chaque amino-acide paraissait être identique à celui de la protéine normale. Ainsi, d'après ces auteurs, les différences entre protéines

sériques normales et anormales dans le myélome multiple ne porteraient que sur la quantité totale présente.

On doit cependant rappeler que la protéine de BENICE-JONES a une composition en acides aminés qui lui est propre et qui ne ressemble en rien aux autres fractions protéiques du plasma ou de l'urine [103].

#### b) COMPOSITION DIFFÉRENTE EN AMINO-ACIDES

Depuis quelques années, bon nombre d'auteurs ont pu montrer des différences de composition suivant les protéines et suivant les diverses affections envisagées. C'est ainsi que SCHREIER [117] a montré les différences existant entre la composition en acides aminés de la sérum-albumine plasmatique et de la fraction albuminique présente dans les urines au cours de la néphrose lipoïdique.

M. POLONOWSKI [99] fut un des premiers à mettre en évidence des différentes teneurs en acides aminés. CUNNINGS et FLYNN [36] font ressortir les variations importantes des bases hexoniques dans les protéines sériques. Suivant l'affection envisagée : maladie hépatique, néphrose ou myélome, on peut observer des augmentations ou diminutions de la teneur en arginine, lysine ou histidine des trois grandes fractions des protéines sériques : sérum-albumine, globuline  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

Il nous paraît naturel de penser que de telles variations sont décelées par le test à l'acide phytique.

Certains chercheurs se sont attachés à étudier les variations de tel ou tel groupement caractéristique. C'est ainsi que B. ROBERT et L. ROBERT [107] ont pu mettre en évidence des diminutions importantes de groupements SH dans des affections cancéreuses ou tuberculeuses.

CAPUTO [25] fait ressortir la diminution des groupements acides de la sérum-albumine dans le myélome multiple.

PUTNAM et MIYAKE [102 bis] pensent que le dosage du N terminal est préférable au dosage des acides aminés, mais il y a des cas où la molécule semble cyclique et il est alors impossible de trouver des groupes aminés terminaux.

#### 2) LES METHODES PHYSIQUES APPORTENT-ELLES UNE SOLUTION AU PROBLEME ?

Pour resserrer le problème de plus près, de nombreux auteurs ont pensé encadrer les analyses chimiques par des tests physiques.

C'est ainsi que ROWE [117] a étudié le poids moléculaire de protéines normales et pathologiques. Il a déterminé le poids moléculaire de sérum-albumine et  $\gamma$  globuline du sérum de sujets normaux et de sujets atteints de néphrose lipoïdique. Il y a ajouté l'étude des protéines urinaires dans cette affection. Il a pu observer que les ultra-filtrats présentaient certaines similitudes de leurs réactions immuno-chimiques et des résultats peu différents pour le poids moléculaire. Mais il lui est difficile de conclure et il pense que les glucoprotéines éventuellement présentes diminuent la sensibilité des tests. Ses résultats, dans l'ensemble, sont peu concluants.

JIRGENSON [75] montre par contre que la sérum-albumine de cancéreux présente une rotation optique anormale, mais la sédimentation à l'ultra-centrifugation est identique à la sérum-albumine normale.

Le même auteur, avec COOPER [76], a montré que dans des maladies néoplasiques les globulines présentaient une mobilité électrophorétique identique à celle des  $\gamma$  globulines normales, mais s'en distinguaient par leurs solubilités, constance de sédimentation, viscosité et rotation optique. Comme explication, ils proposent une modification éventuelle de la structure des protéines.

Toujours d'après ces auteurs [76], 60 pour 100 des anomalies physiques auraient pour origine la présence de glucoprotéines. Mais ils ont observé que 8 pour 100 des sérum-albumines de cancéreux étudiées étaient normales.

Les méthodes de sédimentation et de diffusion ont été appliquées à la sérum-albumine par CHARLWOOD [28]. Les résultats qu'il a obtenus sont différents suivant l'affection :

- dans la néphrose lipoïdique, ces deux méthodes physiques conduisent à un poids moléculaire modifié ;
- par contre, dans les affections hépatiques, le poids moléculaire de la sérum-albumine est identique à celui de la protéine normale.

### 3) CONCLUSIONS

Tous ces résultats différents, souvent contradictoires, semblent cependant indiquer de profondes modifications dans la nature des protéines pathologiques.

Ces modifications paraissent dues surtout à des teneurs variables en acides aminés particuliers : méthionine, cystéine (groupement SH), bases hexoniques (groupement  $\text{NH}_2$ ), tyrosine (groupement phénolique OH), acides aminés dicarboxyliques ( $\text{COOH}$ ).

#### IV. — HYPOTHÈSES PROPOSÉES

Nous venons de voir que l'ensemble des auteurs est favorable à la composition variable en acides aminés des protéines pathologiques. ROTT et ses collaborateurs [110] ont fait ressortir davantage encore les différences existant entre  $\gamma$  globulines normales et  $\gamma$  globulines du goitre lymphadénoïdique.

D'autre part, il a été reconnu que la protéine de Bence-Jones n'avait pas de protéines plasmatiques pour origine, mais qu'elle était au contraire synthétisée aux dépens d'acides aminés plasmatiques [102].

Enfin, les protéines urinaires n'ont pas forcément leur origine dans les protéines plasmatiques [101].

Dans le plasma, il semble que chaque fraction protéique ait son origine propre. Schématiquement, la cellule hépatique élabore la sérum-albumine, le système réticulo-endothélial des globulines.

Mais chaque protéine est elle-même constituée de plusieurs fractions.

La sérum-albumine a donné lieu à de nombreux travaux rapportés par ENSELME et DREYFUS [43]. Ces auteurs ont montré la complexité de cette protéine et toutes les fractions qui en ont été séparées.

SÖRENSEN [120] avait déjà montré l'hétérogénéité de la sérum-albumine aux environs de 1930. Ces dernières années, ce fait avait été oublié. Plus récemment, en 1954, SAÏFER [115], en utilisant l'électrophorèse, a pu confirmer les résultats de SÖRENSEN.

Récemment, ASKONAS [7] et ses collaborateurs ont montré que les différentes fractions protéiques constituant la  $\gamma$  globuline étaient synthétisées par des cellules différentes au sein du tissu générateur de  $\gamma$  globuline.

Ainsi il semble que dans chaque tissu spécialisé dans l'élaboration d'une protéine déterminée, certaines cellules élaborent une fraction différente de cette protéine.

En outre, HARTMANN et GRUBE [67 bis] ont montré que dans une  $\beta$  globuline il y avait une fraction qui paraissait ne jamais changer. On peut donc supposer que suivant l'affection considérée, une ou plusieurs des lignées cellulaires élaborent une sous-fraction déterminée de la protéine (sérum-albumine,  $\gamma$  globuline, etc.), peuvent être atteintes et élaborer alors une sous-fraction protéique anormale. Au début, la majorité des sous-fractions protéiques ne seraient pas touchées et le Nb serait voisin de la normale.

Puis au fur et à mesure, l'atteinte des différentes cellules au sein d'un même tissu se traduirait par la production de sous-fractions de plus en plus anormales. Le Nb de la protéine montrerait alors des modifications, dont l'amplitude serait en rapport avec le nombre de cellules atteintes.

Le test à l'acide phytique nous a montré de fortes variations de la teneur en bases hexoniques des protéines dans différentes affections.

— Dans les affections hépatiques, une atteinte de la cellule hépatique élaborant la sérum-albumine se manifestait par une baisse de la teneur en groupements basiques. Le test à l'acide phytique ne nous permet pas de déceler sur quelle fraction portent ces modifications, il ne les fait ressortir qu'en bloc.

— Dans les affections rénales, nous avons pu montrer que le test à l'acide phytique permettait de déceler dans les urines des protéines à Nb voisins de celui de la sérum-albumine plasmatique. Nous avons émis l'hypothèse de passage à travers le filtre rénal de fractions albuminiques anormales.

— Enfin, dans les infections bactériennes ou virales, l'augmentation des groupements basiques est très importante et semble apporter un argument en faveur de l'élaboration préférentielle de protéines à caractères basiques ; ou tout au moins de sous-fractions protéiques à caractères basiques.

L'acide phytique nous a permis de suivre l'augmentation de la teneur en bases hexoniques des protéines plasmatiques (sérum-albumines,  $\beta$  et  $\gamma$  globulines dans le rhumatisme articulaire aigu et  $\gamma$  globulines dans l'ictère à virus).

Cette augmentation ne serait-elle pas en rapport avec l'action bactériostatique et virulicide des protéines basiques retrouvées parmi les facteurs chimiques de l'immunité (properdine, lysozyme, lactémine et plus simplement polypeptides basiques riches en lysine).

Si le test à l'acide phytique n'est pas suffisant pour apporter une solution à ces différents problèmes, il est cependant intéressant de noter qu'il permet l'étude de la teneur globale en bases hexoniques des protéines. Il permet ainsi de compléter les tests de chimie clinique dans l'évolution d'une affection. Il peut apporter quelques renseignements dans la thérapeutique en indiquant la basicité d'une protéine.

Enfin, avec des préparations pharmaceutiques de protéines, il peut servir de critère pour leur nature et leur degré de conservation.

## CONCLUSIONS GENERALES

---

Nous avons appliqué la précipitation par l'acide phytique à l'étude des protéines du sérum et de l'urine.

I. — Au cours des essais préliminaires, nous avons constaté que l'acide phytique à  $\text{pH } 2,30 \pm 0,5$  et dans une proportion telle que l'on ait environ 0,5 mg de phosphore pour 1,5 mg d'azote protéique, précipite intégralement les protéines. Chaque groupe ionisable basique de la protéine est salifié par une fonction acide forte de l'acide phytique. Comme cet acide comprend six radicaux phosphoriques ne possédant chacun qu'une seule fonction acide forte, à chaque atome de phosphore de la combinaison acide phytique-protéine correspond un groupe basique protéique.

Le simple dosage de l'azote et du phosphore total du précipité de phytate de protéine permet la détermination du nombre total des groupes ionisables basiques de la protéine utilisée.

Nous avons exprimé ces groupements basiques par la notation : Nb, qui indique le nombre de groupements basiques salifiables par l'acide phytique dans une protéine de poids moléculaire 100.000 et renfermant 16 pour 100 d'azote.

Nous avons déterminé la teneur en groupes cationiques (basiques) des protéines du sérum sanguin fractionné selon la méthode de COHN. Les valeurs obtenues par le Nb de ces diverses protéines sériques sont sensiblement identiques à celles relevées dans la littérature, en particulier à celles proposées par HAUROWITZ et TRISTRAM.

Le test à l'acide phytique permet ainsi de différencier qualitativement les fractions protéiques et même éventuellement de les doser.

Parmi les applications possibles de la précipitation phytique, nous en avons retenu trois qui paraissent présenter un intérêt dans l'analyse des médicaments : a) étude de la dénaturation du fibrinogène au cours de sa conservation ; b) l'essai d'une préparation commerciale injectable de gamma-globuline et c) l'étude de la conservation de différents solutés protéiques formolés.

II. — Nous avons appliqué la méthode à l'acide phytique à la détermination des groupements aminés basiques (Nbt) des protéines totales du sérum de sujets présumés normaux.

Nous avons observé que la valeur du Nbt était stable et voisine de 120 avec de jeunes enfants, passait à une valeur de 125 avec l'adulte et paraissait augmenter légèrement chez le vieillard. Nous avons montré au cours de ce chapitre (chapitre IV, première partie) que des efforts physiologiques violents ne paraissaient pas avoir de retentissement sur la valeur du Nbt. Nous avons montré que nous pourrions considérer comme pathologique un écart de 10 p. 100 en deçà ou au delà de la valeur moyenne du Nbt.

III. — Dans le même chapitre (chapitre IV, deuxième partie), nous avons rassemblé les résultats obtenus avec le test phytique pour la détermination du Nbt des protéines totales du sérum dans différentes affections : affections hépatiques, maladies infectieuses ou parasitaires, affections tumorales et affections rénales.

Nous avons montré que sur 84 sérums étudiés, plus de la moitié ont présenté des variations de Nbt supérieures à 10 p. 100 par rapport à la valeur moyenne Nbt 125.

Dans cinquante pour cent des sérums, nous avons observé un écart modéré entre la valeur de Nbt, déterminé par l'acide phytique, et la valeur de Nbc, calculé d'après l'électrophorèse (pourcentage de sérum-albumine  $\times 1,42$  + pourcentage de l'ensemble des globulines  $\times 1,0$ ).

Une quinzaine de sérums ont présenté une valeur particulièrement significative du Nbt, elle est en effet supérieure à 142, qui devrait être la limite supérieure si toutes les protéines sériques étaient de la sérum-albumine. Un nombre sensiblement égal de sérums avaient un Nbt inférieur à 100, valeur limite inférieure dans le cas où toutes les protéines ne seraient constituées que par des globulines.

Ces variations importantes ont été observées dans toutes les affections que nous avons pu étudier.

Les modifications de la valeur de Nbt paraissent en outre évoluer parallèlement au degré de l'atteinte pathologique.

IV. — Au cours de la deuxième partie de nos recherches, nous avons proposé une méthode de fractionnement et de précipitation phytique, en vue de la détermination du nombre de groupements aminés basiques Nb de chaque fraction protéique du sérum.

Nous avons utilisé l'électrophorèse sur papier, suivie de l'élution de chaque fraction protéique par une solution saline.

Nous avons montré l'importance du pH et de la force ionique sur la précipitation phytique de très faibles quantités de protéines.

Le test à l'acide phytique nous a permis de déterminer les valeurs du Nb pour chacune des cinq fractions protéiques du sérum de sujets présumés normaux (sérum-albumines et les fractions  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  globulines).

Ces valeurs sont sensiblement identiques à celles calculées d'après la teneur en bases hexoniques relevées dans la littérature.

V. — Nous avons appliqué cette méthode à l'étude du Nb des différentes fractions protéiques au cours de quelques affections (chapitre II, deuxième partie). Nous avons étudié des sérums dans chacun des trois principaux groupes d'affections où nous avons observé des variations pathologiques de la valeur du Nb : maladies rénales, hépatiques, affections rhumatismales. Nous avons pu, dans quelques cas, suivre un même sujet au cours des différents stades de l'affection.

Nous avons observé que toutes les fractions protéiques du sérum présentaient une variation de leur valeur de Nb, variations s'étaguant pour certaines des fractions entre 15 à 30 p. 100 et quelquefois même plus.

Au cours de ces essais, nous avons relevé des faits tendant à indiquer que l'amplitude des variations du Nb paraissait en rapport avec la gravité de l'affection.

VI. — Dans une troisième partie, nous avons proposé une méthode pour la détermination du Nb des protéines urinaires.

Nous avons montré l'influence des principaux constituants aminés et en particulier le rôle de l'acide urique. Nous avons fait ressortir l'intérêt d'une dialyse préalable des urines.

De cette façon, nous avons pu comparer, au cours de la néphrose lipoïdique, la valeur du Nb des protéines sériques et des protéines présentes dans les urines (albumines et  $\gamma$  globulines).

Les variations du Nb de la fraction albuminique des urines présentaient des variations parallèles, en direction et en grandeur, aux variations enregistrées pour les albumines sériques au cours de l'évolution de la néphrose lipoïdique.

Les  $\gamma$  globulines de l'urine ont le même Nb que celles du sérum, ce Nb demeurant à une valeur normale au cours de la néphrose lipoïdique.

VII. — Enfin, dans une quatrième partie, nous avons procédé à une discussion générale de l'ensemble des résultats.

a) Nous avons rappelé que la salification des groupements aminés basiques des protéines, par l'acide phytique, était toujours une réaction stœchiométrique.

b) Nous avons montré ensuite que la précipitation phytique était sélective, ceci que les protéines se trouvent en présence de leur produit de dégradation, ou bien qu'elles soient liées aux stérols, aux lipides, aux acides gros ou à des pigments. La sélectivité de la précipitation phytique étant particulièrement importante à considérer pour l'étude du Nb des différentes fractions protéiques au cours des affections diverses étudiées.

c) Nous avons pu montrer que le test à l'acide phytique permettait d'étudier les protéines et mettait en évidence des teneurs anormales en bases hexoniques. Il semble donc apporter une confirmation de la présence de protéines anormales dans les diverses affections que nous avons pu étudier.

Le test à l'acide phytique nous paraît être un test simple de biochimie clinique pour étudier des protéines pathologiques et suivre l'évolution d'une affection.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. ABLOT (G.). — *Sem. Hôpit.*, 1954, 6, 2.533.
2. ABLOT (G.), DUPERRY (R.), HERMAN (J.) et CORTEVILLE (M.). — *Sem. Hôpit.*, 1954, 6, 2.354 et 2.547.
3. ARDRY (R.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1949, 7, 407.
4. ARDRY (R.), BARRÉ (R.), COURTOIS (J.-E.) et STOCK (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1.053.
5. ARDRY (R.), BARRÉ (R.), COURTOIS (J.-E.) et STOCK (J.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1954, 12, 541 et 547.
6. ARDRY (R.) et STORCK (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1.077.
7. ASKONAS (B.A.), HUMPHREÉ (J.E.) et PORTER (R.R.). — *Biochem. J.*, 1956, 63, 412.
8. BADIN (J.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1956, 15, 625.
9. BARRÉ (R.). — *Th. Doct. Sc. Phys.*, Paris, 1953.
10. BARRÉ (R.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1956, 14, 182.
11. BARRÉ (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 899.
12. BARRÉ (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 907.
13. BARRÉ (R.) et COURTOIS (J.-E.). — *Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 921.
14. BARRÉ (R.) et COURTOIS (J.-E.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1953, 11, 653.
15. BARRÉ (R.), COURTOIS (J.-E.) et WORMSER (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 455.
16. BARRÉ (R.), COURTOIS (J.-E.) et WORMSER (G.). — *Ann. Acad. Sc. Fenn.*, Ser. A II chimica, 1955, n° 60, pp. 104-233.
17. BECKMAN (W.W.), HILLER (A.), SHEDLOOSKY (T.) et ARCHIBALD (R.M.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, 148, 247.
18. BENHAMOU. — *XXIX<sup>e</sup> Congrès Fr. de Médecine*, Paris, Masson édit., 1953.
- 18 bis. BLOCK (R.J.) et WEISS (K.W.). — In « *Amino-acid Handbook* », Springfield (Illinois), C. Thomas édit., 1957, pp. 252 à 257.
19. BONNET DE LA TOUR (J.). — *J. Méd. et Chir. Prat.*, 1955, 136, 171.
20. BOURILLON (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 675.
21. BOURILLON (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 385.
22. BOWMAN (H.G.). — *Nature*, 1955, 175, 898.

23. BURTIN (P.). — *2de Colloquium Sint-Jans Hospital, Brugge, Bruxelles*, Arsclia edit., 1955, p. 60.
24. BRAND (E.) et coll. — *J. Clin. Invest. U.S.A.*, 1944, 23, 437.
25. CAPUTO (A.). — *Z. Krebsforsch. Dtsch.*, 1955, 60, n° 3, 373.
26. CHARBONNIER (R.), BAESSENS (J.) et CAROLI (J.). — *Ann. Biol. Chir. Fr.*, 1953, 5 et 6, 303.
27. CHAPTAL (J.), JEAN (R.), CAMPO (Mlle R.) et ABRAM (Mlle D.). — *Presse Méd.*, 1955, 63, 264.
28. CHARLWOOD (P.A.). — *Biochem. J.*, 1954, 56, 280.
29. COHN (E.J.), HUGHES (W.L.) et WEARE (J.H.). — *J. Am. Chim. Soc.*, 1947, 69, 1.753.
30. COHN (E.J.), MAC MEEKING (F.L.), ONCLEY (J.L.), NEWELL (J.M.) et HUGHES (W.L.). — *J. Am. Chim. Soc.*, 1940, 62, 3.386.
31. COHN (E.J.), STRONG (H.) et BLANCHARD (M.). — In « *The Proteins* ». Academic Press, New York, 1954, vol. II, part. B, p. 702.
32. COPAUX (H.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1921, 173, 656.
33. COURTOIS (J.-E.) et BARRÉ (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 740.
34. COURTOIS (J.-E.) et BARRÉ (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 913.
35. COURTOIS (J.-E.) et VILLIERS-HUIBAN (Mme H.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1956, 14, 639.
36. CUNNINGS (A.J.) et FLYNN (F.V.). — *J. Clin. Path.*, 1955, 8, 153.
37. DELBARRE (F.). — *Path. Chim.*, in Polonowski, Paris, Masson édit., 1952, Part. II, p. 1.100.
38. DEVIS (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 563.
39. DUMARZET (C.), GHIGLIONE (C.) et BOZZI-TICHADOU (Mme M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 403.
40. EBEL (J.P.) et COLAS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1955, 37, 445.
41. EDSALL (J.T.). — *Adv. Protein. Chem.*, 1947, 3, 393.
42. EDWARDS (J.R.). — *Brit. Med. J.*, 1944, 1, 73.
43. ENSELME (J.) et DREYFUS (J.C.). — *Sémiologie électrophorétique des protéines du plasma sanguin et de l'hémoglobine*. Lyon, Camugli édit., 1955.
44. ENSELME (J.) et TIGAUD (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 823.
45. EFFERSON (P.). — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1952, 4, 104.
46. FONTAINE (T.D.), PONS (W.A.) et IRVING (G.W.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, 164, 487.
47. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol. : Urine 16*, Paris, Véga édit., 1955.
48. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol. : Urine 18*, Paris, Véga édit., 1955.
49. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol. : Urine 6*, Paris, Véga édit., 1955.
50. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol. : Urine 17*, Paris, Véga édit., 1955.

51. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol.* : Urine 8, Paris, Véga édit., 1955.
52. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol.* : Urine 8 bis, Paris, Véga édit., 1955.
53. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol.* : Urine 3, Paris, Véga édit., 1955.
54. FLEURY (P.). — *Fiches Tech. Chim. Biol.* : Sang 8, Paris, Véga édit., 1955.
55. FLEURY (P.), COURTOIS (J.-E.) et EBERHARD (Mlle R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, 33, 190.
56. FLEURY (P.), COURTOIS (J.-E.) et EBERHARD (Mlle R.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, 9, 512.
57. FLEURY (P.) et LECLERC (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 201.
58. GANZIN (M.) et MACHEBŒUF (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, 34, 32.
59. GILLY (R.) et BOUSQUET (J.L.). — *Gaz. Méd. Fr.*, 1957, 1, 47.
60. GORDON (A.H.), KEIL (B.), SCHESTA (K.), KNESSL (O.) et SORM (I.). — *Coll. Trav. Chim. Tchecosl.*, 1950, 5, 1.
61. GORBMAN (A.). — *Endocrinology*, 1945, 37, 177.
62. GRABAR (P.) et WILLIAMS (A.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193.
63. GRASSMAN (W.), HANNING (K.) et KNEDEL (M.). — *Dtsch. Med. Wochschr.*, 1951, 76, 333.
64. GREESPAN (E.M.) et DREILLING (D.A.). — *Arch. Intern. Méd.*, 1953, 91, 474.
65. GROULADE (J.) et BEAUDOUING (A.). — *C.R. Soc. Lyonnaise de Pédiatrie*, 11-12 septembre 1955.
66. HAUROWITZ (T.). — « Chemistry and Biology of Proteins », p. 32. Academic Press edit., New York, 1950.
67. HARTMANN (L.). — *Gaz. Méd. Fr.*, 1954, 61, 549.
- 67 bis. HARTMANN (F.) et GRUBE (R.). — *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 1956, 202, 759-766.
68. HELLOT (R.) et MACHEBŒUF (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, 29, 817.
69. HEUBNER (W.) et STADLER (H.). — *Biochem. Z.*, 1914, 64, 422.
70. HILL (R.) et TYLER (C.). — *J. Agric. Sc.*, 1954, 44, 324.
71. HINSBERG (K.) et LANG (K.). — *Mediz. Chem.*, p. 266. Munchen, Urban et Schwarzenberg édit., 1951.
72. HOFSTEE (J.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1948.
73. ISEMIENS (L.), GROBUS (Ch.), COURTIEUX (L.), LALLEMAND (M.). — *Arch. Soc. Fr. Biol. Méd.*, 1954, 6, 333.
74. JAYLE (M.F.) et BOUSSIER (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 959.
75. JIRGENSON (B.). — *Cancer*, U.S.A., 1955, 8, 908.
76. JIRGENSON (B.) et COOPER (J.A.). — *Clin. Chem. Acta*, 1956, vol. 1, n° 1, p. 1.621.
77. KAYSER (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, 12, 533.
78. LAPRESLE (C.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 89, 654.

79. LAUDAT (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, 9, 143.
80. LIEBERMANN (C.). — *Ber. Dutsch. Chem. Ges.*, 1885, 18, 1803.
81. LIOT (F.). — *Gaz. Méd. Fr.*, 1955, n° 1 du IV, p. 779.
82. LINDENBAUM (S.). — *Bull. Intern. Ac. Polon. Sc. et Let.*, 1926, 1.041.
83. LOISELEUR (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 89, 152.
84. LOISELEUR (J.) et COTINOT (Mlle L.). — *Sem. Hôpit.*, 1955, n° 20.
85. MACHEBŒUF (M.), REBEYROTTE (P.) et LACAÏLLE (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, 29, 402.
86. MAC GARRY (E.), SEHON (A.H.) et ROSE (B.). — *J. Clin. Invest.*, U.S.A., 1955, 34, 832.
87. MARRACK (J.R.) et JOHNS (R.G.). — *Biochem. J.*, 1950, 47, 31.
88. MATTSO (S.) et KOUBLER-ANDERSON (E.). — *Ann. Rep. Ag. Coll. Suède*, 1947, 14, 290.
89. MOUY (M.). — *Gaz. Méd. Fr.*, 1954, n° 1 du III, p. 365.
90. MNICH (E.). — *Bull. Intern. Ac. Polon. Sc. et Let.*, 1926, B, 123.
91. MORIN (M.), LAFON (J.), GRANELON (J.), COLAM (D.), ACA (J.) et LAPLAN (D.). — *Sem. Hôpit.*, 1954, n° 72.
92. MÖRNER (K.). — *Scand. Arch. Physiol.*, 1895, 6, 332.
93. MÜTING (D.). — *Z. Inn. Med.*, 1949, 4, 403.
94. ONCLEY (J.L.), GURD (F.R.N.) et MELIN (M.). — *J. Ann. Chem. Soc.*, 1950, 72, 458.
95. PAGET (M.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1955, 56, 156.
96. PERLMANN (G.F.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 65, 210.
97. PEREZ (C.). — *Tunisie Méd.*, 1955, n° 9.
98. PISCHENGER (E.). — *Bull. Intern. Acad. Polon. Sc. et Let.*, 1931, 13, 123.
99. POLONOWSKI (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, 32, 382.
100. PUTNAM (F.W.). — In «The Proteins»: I.B., Academic Press edit., New York, 1953, pp. 807 et 933.
101. PUTNAM (F.W.) et HARDY (S.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, 212, 361.
102. PUTNAM (F.W.), MEYER (F.) et MIGELSE (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, 221, 517.
- 102 bis. PUTNAM (F.W.) et MIYAKE (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1957, 227, 1.083.
103. RAUEN (H.M. von). — *Biochemisches Taschenbuch*, Edition de Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956.
104. RAYNAUD (R.). — *Sem. Hôpit.*, 1955, 14, 787.
105. RAYNAUD (R.) et ESHANGES (J.R. d'). — *Sem. Hôpit.*, 1954, 13, 4.061.
106. RIGAS (D.A.) et HELLER (C.G.). — *J. Clin. Invest.*, U.S.A., 1951, 30, 853.
107. ROBERT (B.) et ROBERT (L.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1956, 14, 587.

108. ROMANI (J.D.). — *Biol. Med.*, 1956, 155, 74.
109. ROGER (J.), GROULADE (J.) et BEAUDOUING (A.). — *C.R. de la Réunion Lyonnaise de Pédiatrie*, 11-12 septembre 1955.
110. ROITT (I.M.), DONIACH (D.) et CAMPBELL (P.N.). — *Biochem. J.*, 1956, 64, 566.
111. ROYER (P.) et CORBEN (L.). — *Ann. Pédiatrie*, n° de février 1956, p. 107.
112. ROWE (D.S.). — *Biochem. J.*, 1957, 67, 435.
113. RULLIÈRE (R.). — *Gaz. Méd. Fr.*, 1955, 2, 681.
114. RULLIÈRE (R.). — *Gaz. Hôpît.*, 1955, 15, 599.
115. SAIFER (A.) et COREY (H.). — *Proc. Soc. Expres. Biol. et Med.*, 1954, 86, 46.
116. SCHEIDEGGER (J.J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, symposium n° 1.
117. SCHREIER (K.). — *Biochem. Ztschr.*, 1951, 321, 528.
118. SCHONHEIMER (R.) et SPERRY (W.M.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, 106, 745.
119. SMITH (E.L.), BROWN (D.M.), MAC FADDEN (M.L.) et coll. — *J. Biol. Chem.*, 1952, 12, n° 2, p. 601.
120. SÖRENSEN (S.P.L.). — *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 1930, 18, 1.
121. « Standard Values in Blood » : The Committee on the Handbook of Biological Data U.S. Air Force, Dayton, 1951.
122. STEPANOVITCH (P.). — *Gaz. Méd. Fr.*, 1955, 5, 771.
123. STEYN-PARVÉ (E.P.) et TEN-THYE (O.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1955, 16, 609.
124. TAMM (I.) et HORSFOLL (F.L.). — *J. Exp. Med.*, 1952, 95, 71.
125. TERRANOVA (T.) et FEO (F.). — *Bull. Soc. Ital. Biol. Spec.*, 1954, 30, 901.
126. THIVOLLE (L.). — *Compt. Rend. Sc. Soc. Phys. Biol. Fr.*, 1944, 28, 78.
127. TOFFOLI (C.) et MARELLI (O.). — *Rendiconti Istituto Superiore di Sanita*, 1947, 10, 159.
128. TRISTRAM (G.B.). — The amino acid composition of proteins in H. NEURATH and K. BAILEY : « The Proteins », vol. 1, part. A, p. 224. Academic Press edit., New York, 1953.
129. URIEL (J.) et GRABAR (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 1.253.
130. URIEL (J.) et SCHIEDEGGER (J.J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 165.
- 130 bis. WALDENSTRÖM (J.). — *Exp. Ann. Biochem. Med.*, 1957, 19, 45.
131. WALLON (D.). — *Med. et Labor.*, 1953, 27, 217.
132. WIAZOWNICKA (H.). — *Bull. Inter. Ac. Polon. Sc. et Let.*, 1933, 107.
133. WOLVIUS (D.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1955, 74, 596.
134. WOLVIUS (D.) et WERSCHURE (J.C.M.). — *J. Clin. Pathol. G.B.*, 1955, 8, 140.
135. WUHRMANN (F.). — *Exp. Ann. Biochem. Med.*, 1957, 19, 1.



# TABLE DES MATIÈRES

|                      |   |
|----------------------|---|
| INTRODUCTION .. .. . | 1 |
|----------------------|---|

## Première partie

### CHAPITRE I

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| HISTORIQUE .. .. .                                                                            | 5  |
| 1. Recherches sur les combinaisons esters phosphoriques - protéines ..                        | 5  |
| 2. Etude systématique des combinaisons dérivés phosphorés - protéines                         | 5  |
| a) <i>Précipitation des protéines par les dérivés phosphorés en fonction du pH</i> .. .. .    | 6  |
| b) <i>Propriétés particulières de l'acide phytique</i> .. .. .                                | 7  |
| 3. Influence de la réaction du milieu sur les combinaisons acide phytique - protéines .. .. . | 8  |
| a) <i>Milieu neutre ou faiblement alcalin</i> .. .. .                                         | 8  |
| b) <i>Zone faiblement acide</i> .. .. .                                                       | 8  |
| c) <i>Zone acide de pH 4,0 à 2,0</i> .. .. .                                                  | 8  |
| 4. Influence de la structure de la protéine .. .. .                                           | 9  |
| a) <i>Influence du poids moléculaire</i> .. .. .                                              | 10 |
| b) <i>Influence de la teneur en groupes basiques</i> .. .. .                                  | 10 |
| 5. Conclusions .. .. .                                                                        | 10 |

### CHAPITRE II

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| I. — METHODES ANALYTIQUES .. .. .                                   | 11 |
| 1. Précipitation par l'acide phytique .. .. .                       | 11 |
| 2. Dosage de l'azote total .. .. .                                  | 12 |
| 3. Dosage du phosphore sous forme d'acide orthophosphorique .. ..   | 12 |
| 4. Calcul du nombre total de groupes basiques ionisables: Nbt .. .. | 13 |
| 5. Mesure du pH' .. .. .                                            | 14 |
| 6. Electrophorèse sur papier .. .. .                                | 14 |
| 7. Relations entre le rapport albumines/globulines: Nbc .. ..       | 17 |
| 8. Méthode de fractionnement au sulfite de sodium de R. ARDRY ..    | 18 |
| II. — CONSERVATION DES ECHANTILLONS .. .. .                         | 19 |
| 1. Action de la chaleur .. .. .                                     | 19 |
| 2. Influence de la conservation à la glacière .. .. .               | 21 |
| 3. Influence de l'hémolyse .. .. .                                  | 22 |
| 4. Conclusions .. .. .                                              | 23 |

### CHAPITRE III

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ESSAIS PRELIMINAIRES .. .. .                                                                             | 24 |
| 1. Etude des combinaisons de l'acide phytique avec les protéines du plasma .. .. .                       | 24 |
| 1) <i>Précipitation des protéines plasmatiques en fonction du pH</i> ..                                  | 25 |
| 2) <i>Fixation du phosphore dans la combinaison acide phytique - protéines en fonction du pH</i> .. .. . | 28 |
| 3) <i>Discussion des résultats</i> .. .. .                                                               | 28 |
| 4) <i>Recherches sur la précipitation complète des protéines sériques par l'acide phytique</i> .. .. .   | 29 |
| 5) <i>Etude du rapport P/N dans les précipités protéines - acide phytique : Nbt</i> .. .. .              | 30 |
| 2. Applications analytiques possibles .. .. .                                                            | 32 |
| 1) <i>Etude de la dénaturation du fibrinogène</i> .. .. .                                                | 32 |
| 2) <i>Etude d'une <math>\gamma</math> globuline commerciale</i> .. .. .                                  | 32 |
| 3) <i>Conservation de divers solutés protéiques formolés du commerce</i> ..                              | 34 |
| 3. Conclusions .. .. .                                                                                   | 37 |

### CHAPITRE IV

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| APPLICATION DE LA METHODE A L'ACIDE PHYTIQUE AUX SERUMS .. .. .                                                           | 38 |
| 1. Détermination des groupements cationiques (basiques) des protéines totales du sérum de sujets présumés normaux .. .. . | 39 |
| 1) <i>Jeunes enfants</i> .. .. .                                                                                          | 39 |
| 2) <i>Sang du cordon ombilical</i> .. .. .                                                                                | 40 |
| 3) <i>Sujets adultes</i> .. .. .                                                                                          | 41 |
| 4) <i>Vieillards</i> .. .. .                                                                                              | 42 |
| 5) <i>Variations chez un même sujet : accouchement</i> .. .. .                                                            | 43 |
| 6) <i>Après séjour en haute altitude</i> .. .. .                                                                          | 44 |
| 7) <i>Conclusions</i> .. .. .                                                                                             | 46 |
| 2. Etude des variations du Nbt dans différentes affections .. .. .                                                        | 47 |
| 1) <i>Affections hépatiques</i> .. .. .                                                                                   | 48 |
| 2) <i>Maladies infectieuses ou parasitaires</i> .. .. .                                                                   | 52 |
| 3) <i>Affections tumorales</i> .. .. .                                                                                    | 56 |
| 4) <i>Affections rénales</i> .. .. .                                                                                      | 59 |
| 3. Conclusions .. .. .                                                                                                    | 62 |

## Deuxième partie

### CHAPITRE I

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A) DETERMINATION PAR L'ACIDE PHYTIQUE DES GROUPES CATIONIQUES (Nb) DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DU SERUM .. .. . | 65 |
| 1. Choix de la méthode de fractionnement .. .. .                                                                         | 66 |
| 1) <i>Fractionnement par les sels</i> .. .. .                                                                            | 66 |
| 2) <i>Essais d'utilisation de l'électrophorèse en gélose</i> .. .. .                                                     | 66 |
| 3) <i>Essais sur résine échangeuse d'ions</i> .. .. .                                                                    | 66 |
| 4) <i>Méthode utilisée : électrophorèse sur papier</i> .. .. .                                                           | 67 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 2. Techniques utilisées .. .. .                                    | 67 |
| 1) Fractionnement électrophorétique .. .. .                        | 67 |
| 2) Elution .. .. .                                                 | 69 |
| 3) Précipitation phytique .. .. .                                  | 69 |
| 3. Influences de différents facteurs .. .. .                       | 72 |
| 1) Influence de la température .. .. .                             | 72 |
| 2) Humidité du papier .. .. .                                      | 72 |
| 3) Quantité de $\text{ClNa}$ .. .. .                               | 73 |
| 4) Importance du pH pour de faibles quantités de protéines .. .. . | 73 |
| 4. Conclusions déduites de l'étude du protocole opératoire .. .. . | 77 |
| 5. Récapitulation des essais et symboles utilisés .. .. .          | 77 |

## B) RESULTATS OBTENUS .. .. . 78

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Recherche de l'action éventuelle du courant électrique .. .. . | 79 |
| 2. Sérums de sujets présumés normaux .. .. .                      | 81 |
| 3. Discussion. Comparaison avec teneur en amino-acides .. .. .    | 81 |

## CHAPITRE II

### TENEUR EN GROUPES CATIONIQUES DES DIVERSES FRACTIONS PROTEIQUES DU SERUM DANS QUELQUES ETATS PATHOLOGIQUES .. .. . 83

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| 1. Résultats obtenus .. .. .           | 83 |
| 1) Néphrose lipodémique .. .. .        | 83 |
| 2) Rhumatisme articulaire aigu .. .. . | 85 |
| 3) Ictères à virus .. .. .             | 87 |
| 2. Discussion des résultats .. .. .    | 89 |

## Troisième partie

## CHAPITRE I

### EMPLOI DE L'ACIDE PHYTIQUE POUR LA DETERMINATION DES GROUPES CATIONIQUES (BASQUES) DES PROTEINES URINAIRES .. .. . 95

#### A) ESSAIS PRELIMINAIRES .. .. . 97

|                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Influences des principaux constituants urinaires sur le Nb d'une protéine .. .. . | 97  |
| — Urines utilisées .. .. .                                                           | 97  |
| — Solutions utilisées .. .. .                                                        | 98  |
| — Protéines utilisées .. .. .                                                        | 98  |
| 1) Influence sur le Nb de solutions de complexité croissante .. .. .                 | 98  |
| — Protocole opératoire .. .. .                                                       | 98  |
| — Résultats obtenus .. .. .                                                          | 99  |
| — Discussion .. .. .                                                                 | 99  |
| 2) Influence de l'urine dialysée .. .. .                                             | 100 |
| 2. Action de l'urine sur le Nb d'une protéine .. .. .                                | 101 |
| — Protocole opératoire .. .. .                                                       | 101 |
| — Résultats obtenus .. .. .                                                          | 101 |

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1) Rôle particulier de l'acide urique .. .. .                                                       | 103 |
| 2) Importance d'une dialyse de 4 heures contre eau distillée .. ..                                  | 104 |
| 3) Recherche d'une action éventuelle de l'urine sur l'électrogramme ..                              | 105 |
| B) TECHNIQUE PROPOSÉE POUR LA DÉTERMINATION DES GROUPES BASIQUES<br>DES PROTÉINES URINAIRES .. .. . | 107 |
| 1. Prélèvement de l'échantillon et dialyse .. .. .                                                  | 107 |
| 2. Détermination sur l'urine dialysée .. .. .                                                       | 107 |
| 1) <i>Electrophorèse sur papier</i> .. .. .                                                         | 107 |
| 2) <i>Dosage approximatif des protéines</i> .. .. .                                                 | 108 |
| 3) <i>Détermination des Nb des fractions protéiques isolées</i> .. ..                               | 109 |
| 3. Résumé des différents essais successifs .. .. .                                                  | 110 |

## CHAPITRE II

|                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| COMPARAISON DE LA TENEUR EN GROUPES BASIQUES DES<br>PROTEINES DU SERUM ET DE L'URINE AU COURS DE LA<br>NEPHROSE LIPOIDIQUE .. .. . | 111 |
| 1. Résultats obtenus .. .. .                                                                                                       | 111 |
| 1) <i>Sérums</i> .. .. .                                                                                                           | 111 |
| 2) <i>Urines</i> .. .. .                                                                                                           | 113 |
| 3) <i>Comparaison des sérums et urines</i> .. .. .                                                                                 | 115 |
| 2. Discussion des résultats .. .. .                                                                                                | 116 |

## Quatrième partie

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS .. .. .                                     | 121 |
| 1. La réaction est toujours stœchiométrique .. .. .                           | 121 |
| 2. La précipitation phytique est sélective .. .. .                            | 122 |
| 1) <i>Les protéines en présence de leurs produits de dégradation</i> ..       | 122 |
| — <i>Dans l'étude d'une <math>\gamma</math> globuline commerciale</i> .. .. . | 122 |
| — <i>Dans la dégradation pepsique de l'œdème</i> .. .. .                      | 123 |
| — <i>Dans l'étude des protéases</i> .. .. .                                   | 123 |
| 2) <i>Les protéines liées</i> .. .. .                                         | 123 |
| — <i>Aux stérols</i> .. .. .                                                  | 124 |
| — <i>Aux lipides</i> .. .. .                                                  | 125 |
| — <i>Aux acides gras</i> .. .. .                                              | 126 |
| — <i>Aux pigments (bilirubine)</i> .. .. .                                    | 127 |
| 3) <i>Conclusions</i> .. .. .                                                 | 127 |
| 3. Le problème des protéines anormales .. .. .                                | 128 |
| 1) <i>La composition en acides aminés</i> .. .. .                             | 128 |
| — <i>Même teneur en amino-acides</i> .. .. .                                  | 128 |
| — <i>Composition différente en acides aminés</i> .. .. .                      | 129 |
| 2) <i>Les méthodes physiques apportent-elles une solution au problème ?</i>   | 129 |
| 3) <i>Conclusions</i> .. .. .                                                 | 130 |
| 4. Hypothèse proposée .. .. .                                                 | 131 |
| CONCLUSIONS GENERALES .. .. .                                                 | 133 |
| BIBLIOGRAPHIE .. .. .                                                         | 137 |

DEUXIEME THESE

---

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

# ACIDE GLUCURONIQUE

Vu, le Président de Thèse :  
J.-E. COURTOIS

Vu, le Doyen de la Faculté :  
R. FABRE

Vu et Permis d'imprimer,  
le Recteur de l'Académie de Paris :  
J. SARRAILH

SERIE E, N° 76





